



Universidade de Coimbra

Faculdade de Ciência e Tecnologia

Departamento de Física

Fluorometria Ocular Clínica

Mónica Raquel Pedrosa Alberto

Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica

Coimbra, Setembro de 2008



Universidade de Coimbra

Faculdade de Ciência e Tecnologia

Departamento de Física

Fluorometria Ocular Clínica

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra para completar os requerimentos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, sob a orientação do Professor Doutor José Paulo Domingues do Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Mónica Raquel Pedrosa Alberto

Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica

Coimbra, Setembro de 2008

Agradecimentos

O desenvolvimento deste trabalho foi uma experiência bastante enriquecedora, pois trouxe-me várias valências, nomeadamente, em áreas nunca estudadas anteriormente por mim. Esta tese representa então todo o trabalho, dedicação e por vezes sacrifício realizado durante todo o ano lectivo. Quero agradecer por isso a todas as pessoas que directa ou indirectamente me ajudaram ao longo do ano:

Ao meu orientador, Professor Doutor José Paulo Domingues, por todo o apoio, orientação, ensinamentos e dedicação demonstradas ao longo da realização de todo o trabalho.

Ao Professor Francisco Caramelo, por toda a disponibilidade e ajuda sempre que precisei, um muito obrigado.

Ao Artur Vieira, por toda ajuda prestada durante a fase inicial do trabalho.

Aos meus queridos pais, Gilberto e Lúcia, um profundo agradecimento por todo o apoio, carinho, amor e ensinamentos que me foram transmitidos em todos os momentos da minha vida. Por todo o seu sacrifício para poderem oferecer-me todos os meus estudos, em especial o curso.

Aos meus queridos irmãos, Hugo e Joana, todas as nossas brincadeiras, conversas, todos os nossos momentos juntos têm um brilho especial.

Ao Rui, sempre presente nos bons e menos bons momentos, um sincero muito obrigado pelas suas palavras de coragem que sempre me transmitiu, a sua companhia, partilha de sonhos e ensinamentos constantes.

Aos meus avós, pelas lições de vida transmitidas, pelas mensagens de ânimo e esperança, um muito obrigado.

A todos os meus amigos, não especificando, pois sabem quem são, um muito obrigado pelo companheirismo, ajuda e amizade ao longo de todos estes anos.

Aos meus amigos do posto de trabalho, Ana Pratas, Sara João, Salomé e Castelhana, pela amizade que se criou entre nós e que foi crescendo ao longo do tempo. Por todas os nossos almoços em conjunto, pelas nossas conversas e claro está pela orientação no edifício que me foi dada inicialmente.

Resumo

A fluorometria ocular é uma técnica de diagnóstico ocular que se baseia na medição de fluorescência quer de origem exógena quer de origem endógena. Tem como uma das principais aplicações o diagnóstico precoce da retinopatia diabética, responsável por lesões irreversíveis que podem levar à cegueira. Assim torna-se essencial desenvolver instrumentação e processos de aplicação rotineira em centros clínicos de forma a fazer um rastreio do risco de vir a contrair a patologia. No entanto, esta não é a única aplicação da fluorometria ocular e o seu âmbito de aplicação tem vindo a alargar-se a outro tipo de patologias e a estruturas diversas do globo ocular.

O primeiro fluorómetro ocular surgiu na década de oitenta, designado por *Fluorotran Master* (FM). Devido principalmente ao seu custo elevado, foi desenvolvido um protótipo de um novo fluorómetro ocular, denominado por PAF (*Photodiode Array Fluorometer*). Foi desenvolvida uma nova arquitectura permitindo que este possa ter uma maior resolução, flexibilidade e portabilidade. Grande parte do trabalho foi dedicada ao estudo e compreensão da nova arquitectura e dos seus módulos essenciais – amplificação, conversão analógica-digital, microcontrolador e ao teste do seu funcionamento básico usando funções desenvolvidas em C e pré-programadas (utilizando o MPLAB® IDE (Microchip Technology, EUA)) na memória do dsPIC®. Utilizou-se o Matlab (MathWorks, Inc., EUA) como ferramenta de interface com o utilizador. Essa fase constituiu uma aprendizagem de múltiplos aspectos e conceitos importantes para a prossecução dos objectivos propostos e permitiu até a detecção de algumas incorrecções de *hardware* que foram sendo eliminadas. Finalmente, utilizaram-se soluções de fluoresceína com concentrações conhecidas, e determinou-se o erro de não-linearidade, recta de calibração e o nível mínimo de detecção para dois sensores, ambos de 128 pixéis.

Analisando os resultados preliminares obtidos recorrendo à nova arquitectura, verifica-se que estes estão já na mesma ordem de grandeza dos obtidos com o FM e com o PAF. Assim, e para trabalho num futuro próximo, é fundamental perceber os erros associados às leituras de forma os poder minimizar.

Palavra-chave: Fluorometria Ocular

Índice

Índice	ix
Índice de figuras	xiii
Índice de tabelas	xv
Abreviaturas	xv
1. Introdução	1
2. Fluorofotometria Ocular	3
2.1. Aspectos gerais da anatomia do olho	3
2.1.1. Segmento anterior	4
2.1.2. Segmento posterior	5
2.1.3. Barreiras hemato-oculares	6
2.2. Fluorescência	7
2.3. Fluoróforos	8
2.3.1. Fluoróforos endógenos (intrínsecos ou naturais)	9
2.3.2. Fluoróforos exógenos	9
2.4. Fluoresceína	10
2.4.1. Fluoresceína sódica	11
2.4.2. Efeitos do solvente na emissão da fluorescência	12
2.5. Fluorometria Ocular	12
2.5.1. Introdução	12
2.5.2. Instrumentação	13
2.5.3. Aplicações	13
3. Descrição do sistema de aquisição de dados	15
3.1. Descrição do <i>hardware</i>	15
3.1.1. Sistema Óptico	15
3.1.2. Sensor	16
3.1.3. Acondicionamento de Sinal	22
3.1.4. ADC	23
3.1.5. Microcontrolador dsPIC® (dsPIC30F6012A, Microchip Technology, EUA) 24	
3.1.5.1. Recursos	25
3.1.5.1.1. Osciladores	275

3.1.5.1.2. Low Voltage Detect (LVD)	276
3.1.5.1.4. Reset	276
3.1.5.1.4. Interrupções	27
3.1.5.1.4. Watchdog Timer (WDT)	278
3.1.5.1.4. Temporizadores (Timers)	278
3.1.5.1.7. Memórias	28
3.1.5.1.8. Comunicação com o exterior	29
3.1.5.1.8.1. Interface RS-232	29
3.1.5.1.8.2. Interface USB	29
3.1.5.1.9. Módulo SPI TM (<i>Serial Peripheral Interface</i>)	34
3.1.6. Fonte de alimentação	34
4. Descrição do <i>Software</i>	37
4.1. Ferramentas de desenvolvimento	37
4.1.1. MPLAB [®] IDE	37
4.1.2. MATLAB	38
4.1.3. Hyperterminal:	38
4.2. <i>Software</i> implementado no microcontrolador:	39
4.2.1. Descrição dos comandos	39
4.3. MATLAB:	47
4.4. Envio dos comandos:	51
4.4.1. HyperTerminal	51
4.4.2. Matlab:	51
5. Resultados obtidos e Discussão	53
5.1. Ganho do amplificador de ganho programável	53
5.2. Resultados obtidos com o sensor de luz da Hamamatsu S3921	54
5.2.1. Sensor 1	55
5.2.2. Sensor 2	56
6. Conclusões finais	59
6.1. Conclusão	59
6.2. Dificuldades encontradas ao longo do trabalho	59
6.3. Trabalho futuro	60
7. Referências	61

Apêndices	I
Apêndice A: Porta série.....	I
A.1.Detalhe dos pinos do conector DB-9.....	I
A.2.Descrição dos parâmetros de configuração da porta série.....	I
Apêndice B: Esquemático dos modos electrónicos do sistema de aquisição de dados..	III
B.1. Módulo das comunicações com o exterior.....	III
B.2. Módulo da fonte de alimentação.....	V
B.3. Módulo do acondicionamento de sinal.....	VIII
B.4. Módulo do ADC	X
B.5. Módulo do microcontrolador (dsPIC30F6012A, Microchip Technology, Inc., EUA).	XI

Índice de figuras

Figura 1: Anatomia geral do olho humano (Adaptado de [1]).....	3
Figura 2: Segmento posterior e anterior do globo ocular. (Adaptado de [2] [4]).....	4
Figura 3: Diagrama de <i>Jablonski</i> . S_0 = nível energético inicial (fundamental); S_1 = primeiro nível excitado <i>singlet</i> ; S_2 = segundo nível excitado <i>singlet</i> ; e T_1 = primeiro nível excitado <i>triplet</i> . (Adaptado de [14])	7
Figura 4: Estrutura química da fluoresceína sódica (peso molecular de 376 g/mol) [19].	11
Figura 5: Curvas de excitação e emissão da fluoresceína sódica. (Adaptado de [21]) ..	11
Figura 6: Registos de fluorofotometria antes (a) e após (b) injeção endovenosa de fluoresceína num doente diabético. (Adaptado de [1])	12
Figura 7: Sistema óptico do sistema de aquisição de dados, onde α representa o ângulo da lâmpada de fenda (Adaptado de [9]).....	15
Figura 8: Diagrama de blocos do sistema de aquisição de dados, no qual é distinguido o sensor.	16
Figura 9: Diagrama temporal da aquisição de dados.	17
Figura 10: Diagrama de blocos do acondicionamento do sinal.	22
Figura 11: Diagrama de blocos do sistema de aquisição de dados, onde é realçado o ADC.....	23
Figura 12: Diagrama de blocos da interface RS-232.....	30
Figura 13: Transmissão série assíncrona (Adaptado de [22]).	30
Figura 14: Ligação entre os conectores DB-9 (fêmea) e DB-9 (macho) sem controlo de fluxo.....	31
Figura 15: Diagrama do módulo UART.	32
Figura 16: Diagrama de blocos da interface USB.	33
Figura 17: Conector USB da série B. (a) Conector fêmea, (b) Conector macho. Descrição dos pinos: 1:Vcc, 2: D-, 3:D+ e 4:Terra.	33
Figura 18: Diagrama de blocos da fonte de alimentação.	35
Figura 19: Diagrama de blocos do gerador de tensão de referência.	36
Figura 20: Conexão entre o computador, ICD 2 sistema de aquisição de dados. (adaptado de [3])	37

Figura 25: Fluxograma representativo do <i>software</i> desenvolvido.	39
Figura 26: Saída do comando ADC.	41
Figura 27: Diagrama do comando DEC (*Ganho poderá ser 1, 2, 4 ou 8).	42
Figura 28: Diagrama do comando INC (*Ganho poderá ser 2, 4, 8 ou 16).	42
Figura 29: Diagrama representativo do comando READ (<i>x</i> e <i>y</i> correspondem aos valores da variável <i>temp</i> no modo <i>signed</i> e <i>unsigned</i> , respectivamente).	43
Figura 30: Diagrama do comando WAKE.	44
Figura 31: Diagrama do comando SLEEP.	44
Figura 32: Comandos 1000 e ACQ (* <i>x</i> corresponde a 2048 e <i>y</i> a 0).	45
Figura 33: Comando MEDIA (<i>y</i> corresponde ao número da iteração (0 a 1999) e <i>z</i> o correspondente valor da saída do ADC resultante da média de 16 aquisições).	46
Figura 34: Esquema representativo do comando CCD.	46
Figura 21: Janela de aquisição.	48
Figura 22: Janela relativa à implementação do comando ADC.	49
Figura 23: Janela de configuração dos parâmetros de aquisição.	50
Figura 24: Janela de pós-aquisição.	50
Figura 35: Gráfico representativo da saída do sensor para diversos valores de ganho programável.	53
Figura 36: Recta de calibração do sensor 1.	55
Figura 37: Distribuição das leituras no escuro efectuadas com o sensor 1.	56
Figura 38: Recta de calibração para o sensor 2.	56
Figura 39: Distribuição gráfica das leituras do fundo no escuro realizadas com o sensor 2.	57

Índice de tabelas

Tabela 1: Características gerais do microcontrolador (dsPIC30F6012A, Microchip Technology, EUA) [31, 32].	25
Tabela 2: Modificação da saída do ADC.	51
Tabela 3: Descrição dos comandos implementados do microcontrolador.	40
Tabela 4: Descrição da saída do comando ADC.	41

Abreviaturas

ADC: Analog-to-Digital Converter (em português, Conversor analógico/digital)

FM : *Fluorotran Master*

PAF: *Phododiode Array Fluormeter*

RS-232: *Recommended Standard 232*

SAD: Sistema de Aquisição de Dados

UART: *Universal Asynchronous Receiver/Transmitter.*

1. Introdução

A fluorometria ocular é uma técnica relativamente recente que tem como principal objectivo detectar se possível precocemente determinadas patologias, nomeadamente a retinopatia diabética. É uma área de estudo de grande interesse na Universidade de Coimbra, mais propriamente na divisão de instrumentação do Instituto Biomédico de Investigação da Luz e Imagem (IBILI). Neste âmbito, foi desenvolvido um fluorómetro ocular designado por PAF (*Photodiode Array Fluorometer*). Porém, a sua base *hardware* evolui num sentido de uma maior portabilidade, flexibilidade e resolução.

Assim, o presente trabalho teve como principais objectivos o estudo de equipamento de fluorometria existente no IBILI, nomeadamente o PAF, bem como o estudo de uma nova arquitectura realizando algumas experiências de modo a testar o seu funcionamento e versatilidade e evidenciar as novas possibilidades deste novo sistema de aquisição de dados (SAD) como um novo fluorómetro ocular.

Este trabalho está dividido em seis capítulos. Neste capítulo, a introdução, encontram-se descritos os objectivos e a contribuição do trabalho realizado e a organização estrutural do documento, resumindo o conteúdo de cada um deles.

O segundo capítulo é dedicado à apresentação do conceito de Fluorofotometria Ocular. Aqui, são descritas noções gerais da anatomia do olho, é exposto o conceito de fluorescência, são referidos fluoróforos quer endógenos quer exógenos e, por fim, a técnica de Fluorometria Ocular e as suas aplicações.

No terceiro capítulo é feita a descrição do *hardware* do novo (SAD).

O *software* desenvolvido em *Matlab* e o implementado para correr no microrcontrolador são apresentados no capítulo quatro.

As experiências efectuadas são descritas e os dados obtidos são analisados e discutidos no capítulo cinco. Determinou-se o erro de linearidade do sistema e a sua recta de calibração. Com base nas medições do fundo (escuro), determinou-se o nível mínimo de detecção.

No capítulo seis é apresentada a conclusão do trabalho realizado, realçando as dificuldades encontradas durante a sua execução e sugestões de trabalho futuro.

Durante a execução deste projecto, foi elaborado um artigo para apresentação numa conferência internacional:

José P. Domingues, Mónica Alberto, Carlos Correia, J. Cunha-Vaz, *Slit-lamp Based Ocular Fluorometry Scanning*, 14th Nordic – Baltic Conference on Biomedical Engineering and Medical Physics (NBC -2008), 16 a 20 de Junho, 2008, Riga Technical University, Riga, Letónia.

2. Fluorofotometria Ocular

Neste capítulo será revisto o conceito de fluorofotometria ocular assim como a sua implementação e aplicação. Serão apresentados o processo de fluorescência e vários tipos de fluoróforos, quer endógenos quer exógenos, realçando a fluoresceína, o mais utilizado em oftalmologia. Para auxiliar a exposição destes temas são descritos sucintamente alguns aspectos gerais da anatomia do olho humano.

2.1. Aspectos gerais da anatomia do olho

O globo ocular é o órgão responsável pela visão. Nele são realizados os fenómenos ópticos e fotoquímicos que irão permitir que uma imagem do mundo exterior seja transformada em impulsos nervosos e conduzida ao cérebro, onde será interpretada [1]. A figura 1 representa a anatomia interna do globo ocular identificando as suas estruturas componentes.

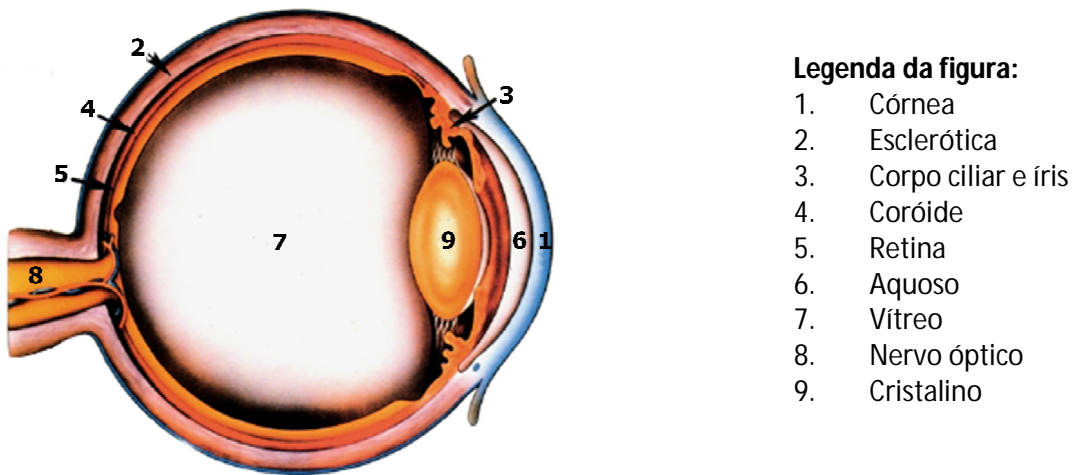


Figura 1: Anatomia geral do olho humano (Adaptado de [1]).

A estrutura do globo ocular pode ser dividida de vários modos, sendo a divisão mais comum em dois segmentos distintos, o segmento anterior e o segmento posterior. O segmento anterior é definido como a parte do olho que se estende deste o cristalino para a frente (cristalino, córnea, corpo ciliar, íris e humor aquoso). Já o

segmento posterior compreende as estruturas restantes, estruturas posteriores ao segmento anterior (humor vítreo, retina, coróide e nervo óptico). A figura 2 representa as estruturas que compõem cada um dos segmentos.

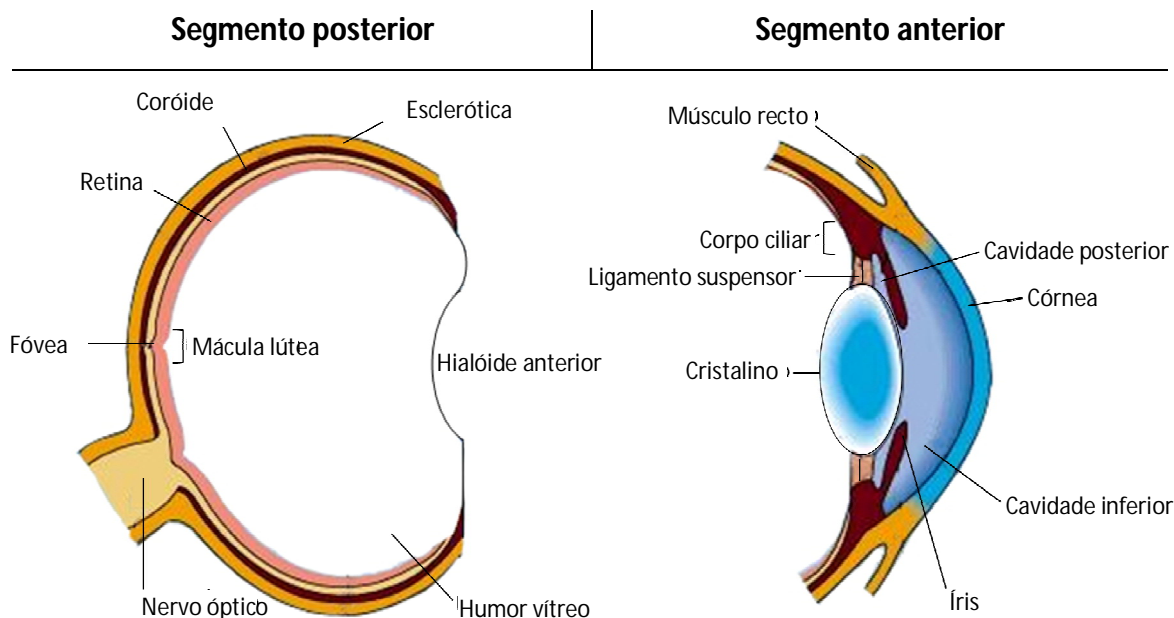


Figura 2: Segmento posterior e anterior do globo ocular. (Adaptado de [2] [3])

2.1.1. Segmento anterior

- **Córnea**

A córnea é uma estrutura transparente, arqueada e está desprovida de inervação [5]. É composta por 5 camadas diferentes, de fora para dentro, o epitélio, a camada de *Bowman*, o estroma, a membrana de *Descemet* e por fim o endotélio [2]. A córnea é a primeira estrutura e a principal do olho que refracta os raios de luz provenientes dos vários pontos do exterior [4].

- **Cristalino**

O cristalino é transparente, biconvexo, envolto por uma membrana elástica e tal como a córnea não possui inervação. A sua potência refractiva é menor que a da córnea, contudo é ajustável pela mudança da sua curvatura através do músculo ciliar, permitindo assim a focagem de luz proveniente de objectos a distâncias diferentes [4, 5].

- **Humor aquoso**

O humor aquoso é uma substância transparente que preenche o espaço entre a córnea, corpo ciliar, a íris e o cristalino, e o seu índice de refração é de 1,336 [1, 5]. Tem como principais funcionalidades a manutenção da pressão intra-ocular, refração da luz e nutrição dos tecidos oculares [6]. Está em constante renovação e é escoado através do canal de *Schlemm*. A produção e remoção do humor aquoso permitem que seja mantida a sua pressão intra-ocular, caso isto não aconteça surge uma patologia denominada por glaucoma [6].

- **Corpo ciliar**

O corpo ciliar é extremamente importante para a saúde e função do olho pois produz o humor aquoso e as suas fibras musculares controlam a curvatura do cristalino [3, 7].

- **Íris**

A íris é uma estrutura contráctil e possui uma abertura designada por pupila. Tem a função de regular a quantidade de luz que entrada no olho através do controlo do tamanho da pupila [6].

2.1.2. *Segmento posterior*

- **Humor vítreo**

O humor vítreo preenche o segmento anterior, ocupando cerca de 80% do volume do globo ocular [5, 6]. Consiste num fluido gelatinoso e transparente e o seu índice de refração é semelhante ao do humor aquoso [1, 6]. Esta substância não é produzida com a mesma regularidade que o humor aquoso, tornando a sua renovação bastante lenta. O humor vítreo ajuda na manutenção da pressão intra-ocular, de modo a manter a forma do globo ocular segurando também a retina e o cristalino [6].

- **Retina**

A retina cobre o fundo do olho e é responsável por recolher a luz focalizada pela córnea e pelo cristalino. As células fotossensíveis da retina (bastonetes e cones) convertem a luz em sinais eléctricos os quais são amplificados e enviados ao cérebro para a sua interpretação e construção de imagens[3].

- **Coróide**

A coróide é altamente irrigada por veias e artérias sanguíneas que nutrem e oxigenam a retina da sua camada mais externa. Ela é também densamente pigmentada evitando a reflexão interna da luz [1, 7].

- **Nervo óptico**

O nervo óptico (II) conduz os impulsos visuais captados pelas células fotossensíveis até ao cérebro, onde são depois interpretados [3].

2.1.3. Barreiras hemato-oculares

O globo ocular é provido de um sistema restritivo de permeabilidade, isto é, existem nele barreiras entre o sangue e os fluidos oculares que são diferentes para os segmentos anterior e posterior. Embora haja comunicação através da difusão entre o humor aquoso e o humor vítreo, é fundamental distinguir duas barreiras, a barreira hemato-retiniana (BHR) e a barreira hemato-aquosa (BHA). A barreira hemato-aquosa regula as trocas entre o sangue e o humor aquoso envolvendo principalmente o corpo ciliar e a íris, onde prevalecem os movimentos de entrada de substâncias no globo ocular [1]. Por outro lado, a barreira hemato-retiniana é responsável pelo equilíbrio ambiental da retina e das células fotossensíveis, regulando as trocas entre o sangue e a retina não vascularizada de onde há difusão e trocas com o vítreo [1, 8]. Aqui predominam o movimento de substâncias do interior para o exterior da retina através do sangue [1]. Esta barreira estabelece-se principalmente nas paredes dos vasos retinianos (componente interna) e na interface corioepitelial (componente externa) [1, 8].

2.2. Fluorescência

A luminescência consiste na emissão de luz a partir de qualquer substância devido a transições entre diferentes estados electrónicos [9, 10]. A fluorescência e a fosforescência são dois casos particulares da luminescência, os quais diferem na natureza do estado excitado [10, 11]. Será apenas descrito o fenómeno de fluorescência, pois a fosforescência não faz parte do âmbito deste trabalho.

Nos meados do século XIX, George Gabriel Stokes introduziu o termo fluorescência ao descobrir que esta pode ser induzida em certas substâncias por estimulação com luz ultra-violeta (UV). Ele observou que a luz emitida tem comprimentos de onda superiores aos da luz de excitação, fenómeno que ficou conhecido por deslocamento de *Stokes* [12].

O processo de fluorescência pode ser dividido em modo geral em três eventos distintos, excitação, conversão interna e emissão, o qual está representado no diagrama de *Jablonski* (ver figura 3). As transições entre os diferentes níveis de energia são descritas pelas linhas verticais. Estas transições ocorrem em cerca de 10^{-15} s, um tempo muito pequeno para o deslocamento significativo dos núcleos [13].

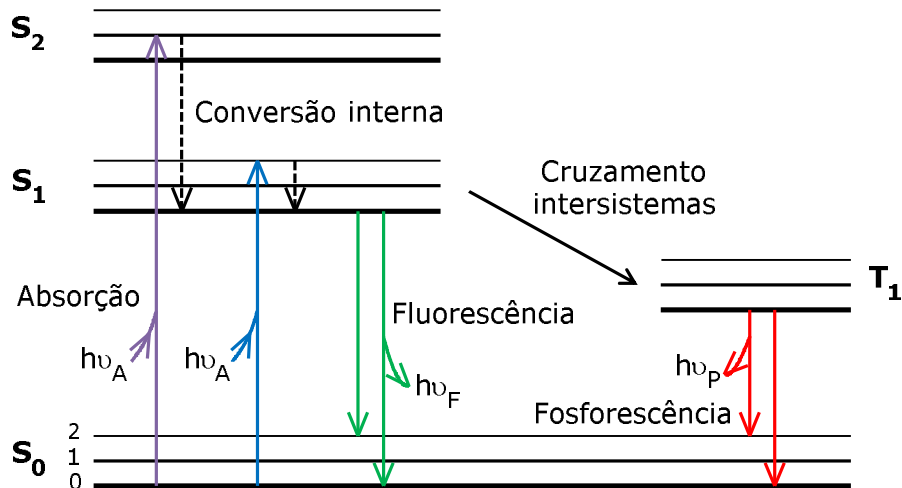


Figura 3: Diagrama de *Jablonski*. S_0 = nível energético inicial (fundamental); S_1 = primeiro nível excitado *singlet*; S_2 = segundo nível excitado *singlet*; e T_1 = primeiro nível excitado *triplet*.¹ (Adaptado de [13])

¹ Em cada um destes níveis podem existir um número de níveis energéticos vibracionais, descritos por 0, 1, 2, etc (os estados de energia rotacional são ignorados).

Em equilíbrio térmico, as moléculas ocupam o nível vibracional mais baixo de S_0 [11]. Quando uma determinada molécula absorve energia², esta é excitada desde o seu nível energético inicial para (geralmente) sub-níveis vibracionais associados a cada um dos estados de excitação *singlet*, S_1 ou S_2 . Salvo raras exceções, a molécula relaxa até ao nível vibracional mais baixo de S_1 . Este processo é designado por conversão interna, e ocorre em, aproximadamente, 10^{-12} s [13]. Daqui, a molécula regressa a S_0 emitindo energia a um comprimento de onda superior ao de absorção (em aproximadamente 10^{-8} s) [9]. Esta diferença entre o comprimento de onda da luz de excitação e emissão é devida ao facto da molécula excitada ter reduzido a sua energia ao passar de níveis *singlet* superiores antes de regressar ao nível energético inicial (S_0) [9]. É de realçar que os tempos de vida da fluorescência são tipicamente quatro ordens de grandeza mais baixos que os da conversão interna, dando as moléculas tempo suficiente para conseguir um equilíbrio térmico no estado excitado de mais baixa energia antes da emissão de fluorescência [13]. É interessante notar que o espectro de emissão de uma molécula é tipicamente uma imagem no espelho do espectro de absorção da transição $S_0 \rightarrow S_1$. Esta similaridade ocorre pois a excitação electrónica não altera significativamente a geometria nuclear. Deste modo, o espaço dos níveis energéticos vibracionais dos estados excitados é idêntico aos do estado energético inicial. Como resultado, as estruturas vibracionais vistas nos espectros de absorção e emissão são idênticas [9, 13].

2.3. Fluoróforos

Existe uma grande variedade de moléculas que quando submetidas a transições electrónicas emitem fluorescência. Estas moléculas são designadas por fluoróforos. Em geral e do ponto vista biológico, os fluoróforos são divididos em duas categorias, fluoróforos endógenos (intrínsecos ou naturais) e exógenos (extrínsecos) [15].

² A molécula deve absorver uma energia igual ao superior à diferença de energia entre os dois níveis de energia para que seja excitada.

2.3.1. Fluoróforos endógenos (*intrínsecos ou naturais*)

Os fluoróforos endógenos também designados por intrínsecos ou naturais referem-se a moléculas “autofluorescentes” que existem naturalmente ou são produzidos nos tecidos, no nosso caso tecidos oculares são o interesse. [5, 11]. A córnea (epitélio e endotélio) possui fluoróforos associados ao metabolismo celular, (formas reduzidas dos nucleótidos pirimídicos, NADH (Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida) e NADPH (Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida) e flavoproteínas (FAD (flavina adenina dinucleotídeo) e FMN (flavina mononucleotídeo)) na sua forma oxidada) e à glicosilação do colagénio do estroma. No epitélio pigmentar da retina encontramos os lipopigmentos (exemplo: lipofuscina) e no cristalino aminoácidos como o triptofano [5, 11].

2.3.2. Fluoróforos exógenos

Por vezes as moléculas de maior interesse num determinado estudo não são fluorescentes ou a sua fluorescência natural não é adequada para a experiência em causa [13]. De forma a contornar esta situação, podem-se usar fluoróforos exógenos, isto é, corantes sintéticos ou moléculas bioquímicas modificadas que são adicionadas à amostra para produzir fluorescência com propriedades espectrais específicas [15]. Durante a última década, o número de fluoróforos tem aumentado brutalmente para as mais diversas aplicações [16]. A fluoresceína e a rodamina são dois dos fluoróforos extrínsecos mais usados, pois não são sensíveis à polaridade do solvente e possuem um elevado coeficiente de absorção molar de aproximadamente $80000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [16]. A partir destes dois podem ser obtidos uma grande variedade de derivados, incluindo isocianatos e isotiocinatos (de fluoresceína e rodamina) [8, 16]. Estes possuem rendimentos quânticos³ elevados e são resistentes ao foto-branqueamento⁴ [8]. Em oftalmologia, o fluoróforo exógeno mais usado é a fluoresceína sódica.

³ Também designado por *quantum yield*, indica-nos a eficiência do processo de fluorescência. É definido como sendo o quociente entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos.

⁴ Também designado por *photobleaching* consiste na destruição fotoquímica do fluoróforo, devido a excitação continuada.

2.4. Fluoresceína

A fluoresceína ($C_{20}H_{12}O_5$) foi sintetizada pela primeira vez em 1871 por Johann Friedrich Wilhelm Adolf van Bayer⁵, a partir da condensação de resorcinol e anidrido ftálico, a uma temperatura de aproximadamente 200°C [17].

Uma das principais aplicações da fluoresceína é no campo da medicina, onde se destaca a oftalmologia, tendo sido utilizada em 1882 por Pluger na detecção de irregularidades no epitélio da córnea [8]. Para além disso, ela pode ter outras utilizações, como por exemplo, em sistemas fluviais (marcação de esferas de tamanho definido para determinar o movimento e velocidade das partículas sedimentares dos rios e oceanos) e em técnicas microbiológicas (exemplo: marcação de anticorpos específicos para diferentes tipos de microrganismos ou outros tipos de células) [17].

Em oftalmologia, depois de a fluoresceína ser administrada ao paciente (intravenosamente ou por via oral), parte dela liga-se a proteínas plasmáticas e a outra parte atravessa as barreiras hemato-oculares atingindo o vítreo ou câmara anterior [8]. A presença de alterações nos olhos, leva a um aumento da permeabilidade destas barreiras e consequentemente a um aumento da quantidade de fluoresceína que atinge o vítreo. Assim, isto permite-nos avaliar a permeabilidade das barreiras hemato-oculares de modo a detectar precocemente certas anomalias. A fluorescência pode ser avaliada de forma qualitativa recorrendo à angiografia fluoresceínica. Quanto à sua avaliação quantitativa, ela pode ser feita recorrendo à fluorofotometria, contribuindo tanto para o diagnóstico precoce de patologias como para o acompanhamento da terapêutica [8]. A partir da fluoresceína podem ser obtidos derivados para diferentes aplicações. É caracterizado de forma mais exaustiva a fluoresceína sódica, pois é o fluoróforo exógeno mais utilizado em fluorofotometria ocular assim como em angiografia fluoresceínica.

⁵ Johann Friedrich Wilhelm Adolf van Bayer (1835-1917) foi premiado pelo Nobel da Química em 1905.

2.4.1. Fluoresceína sódica

A fluoresceína sódica ($C_{20}H_{10}Na_2O_5$, figura 4) é o fluoróforo exógeno mais usado em oftalmologia. Este fluoróforo não corrói nem altera o tecido vivo e tem a capacidade de penetrar no olho quando administrada.

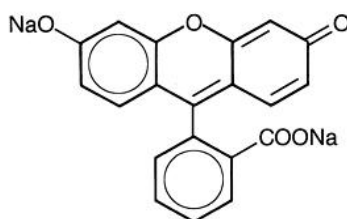


Figura 4: Estrutura química da fluoresceína sódica (peso molecular de 376 g/mol) [18].

A fluoresceína sódica apresenta os picos de absorção e emissão a 460-485nm e 530nm respectivamente (figura 5). A este corante pode-se adicionar água, hidróxido de sódio e/ou ácido hidrocloreico de forma a preparar uma solução injectável [19]. No final, a solução apresenta um pH entre 8 a 9.8. Quando a solução é neutra ou ácida, perde-se fluorescência [19].

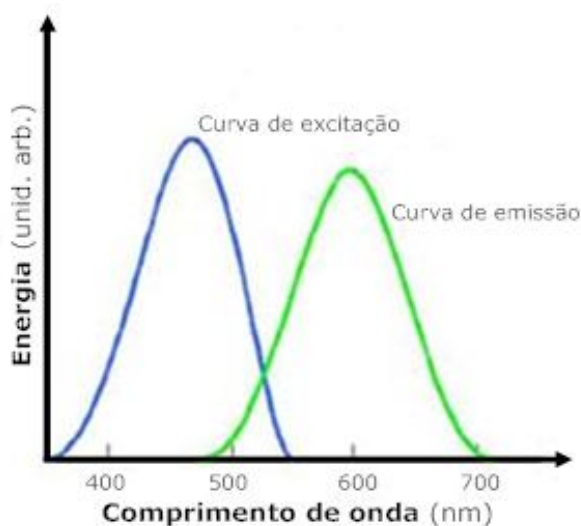


Figura 5: Curvas de excitação e emissão da fluoresceína sódica (Adaptado de [20]).

2.4.2. Efeitos do solvente na emissão da fluorescência

São vários os factores que podem afectar o espectro de emissão e o rendimento quântico da emissão de fluorescência, entre os quais se destacam [21]:

- Interações entre o fluoróforo e as moléculas do solvente envolventes (designado por polaridade do solvente);
- Presença de compostos orgânicos e inorgânicos dissolvidos;
- Temperatura;
- pH;
- Concentração da espécie fluorescente.

2.5. Fluorometria Ocular

2.5.1. Introdução

A fluorometria ocular é uma técnica de diagnóstico não invasivo que se baseia na medição *in vivo* de fluorescência permitindo a quantificação e a detecção de diversas substâncias, endógenas e/ou exógenas, em tecidos e fluidos oculares [8]. A partir desta análise, é possível avaliar parâmetros biológicos quer em indivíduos normais quer em indivíduos com patologia e a partir daí interpretá-los com significado clínico [8]. A figura 6 representa a distribuição de fluorescência ao longo do globo ocular antes e após a injeção intravenosa num doente diabético.

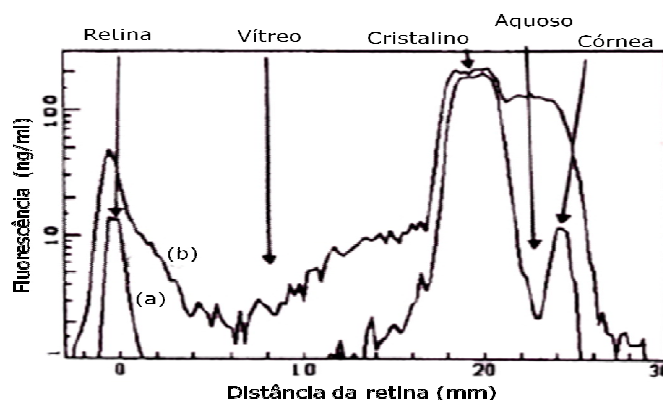


Figura 6: Registos de fluorofotometria antes (a) e após (b) injeção endovenosa de fluoresceína num doente diabético. (Adaptado de [1])

2.5.2. Instrumentação

A técnica de fluorometria ocular surgiu nos meados da década de setenta tendo como principal precursor José Cunha-Vaz, Professor Catedrático da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. A partir daí, multiplicaram-se os estudos nesta área, sendo Coimbra um dos principais centros. Em 1983 surgiu o primeiro instrumento padrão para este fim, designado por *Fluorotron MasterTM* (FM). Houve então um grande esforço por padronizar determinados métodos e protocolos. Neste contexto, no seio do Grupo de Instrumentação do Instituto Biomédico da Investigação e Imagem (IBILI), foi desenvolvido um protótipo de um novo fluorómetro ocular de baixo custo de estado sólido, PAF (*Photodiode Array Fluorometer*) tendo sido obtida uma patente internacional (US Patent 6013034). A sua evolução num sentido de maior portabilidade, flexibilidade e resolução, enveredando-se pela utilização de um microcontrolador dsPIC® (dsPIC30F6012A, MicrochipTechnology Inc., U.S.A.), por uma ligação série rápida ao computador e pela possibilidade de utilização de vários sensores de luz, foi o contexto em que se desenvolveu o presente trabalho.

Neste instituto, foi também desenvolvido um novo método quantitativo que permite medir e fazer o mapeamento da permeabilidade das barreiras hemato-retinianas através da medição da libertação da fluoresceína da corrente sanguínea para o vítreo. Este método é designado por *Retinal Leakage Analyser* (RLA), baseado no Oftalmoscópio confocal de varrimento laser (*Confocal Scanning Laser Ophthalmoscope* - CSLO) [22].

2.5.3. Aplicações

A técnica de fluorometria ocular possui diversas aplicações clínicas, as quais se destacam ao nível das barreiras hemato-oculares, dos segmentos anterior e posterior e investigação farmacológica.

São vários os parâmetros fisiológicos com significado clínico capazes de serem quantificados e detectados no segmento anterior, como por exemplo as permeabilidades do endotélio e epitélio da córnea e das barreiras hemato-oculares, volume lacrimal no saco conjuntival e o fluxo do humor aquoso [8]. Verifica-se

igualmente um grande potencial clínico a nível da fluorescência endógena principalmente da córnea e do cristalino. Existe uma correlação entre a intensidade da fluorescência da córnea e o grau de retinopatia diabética e na presença de diabetes *millutus* (apresenta níveis mais elevados para indivíduos diabéticos quando comparados com indivíduos saudáveis). Por outro lado, no cristalino comprova-se uma variação linear entre a intensidade da sua fluorescência com a idade (em cristalinos saudáveis e diabéticos). Para indivíduos diabéticos, a sua intensidade está também relacionada com a duração da doença [5, 8].

Relativamente ao segmento posterior, é permitido estudar a permeabilidade da barreira hemato-retiniana e todo o transporte associado a ela bem como o coeficiente de difusão do vítreo. Quanto à sua “autofluorescência”, o pigmento lipofusina é o mais abundante na retina e o principal componente do seu epitélio pigmentar. Verifica-se que com um aumento da idade, haver uma relação entre a intensidade de fluorescência endógena com este pigmento aumenta (cerca de 40%) quando sujeita a um comprimento de onda superior a 470nm [5, 8].

A retinopatia diabética é a patologia que provoca um maior número de casos de cegueira nos países ocidentais. Está provado cientificamente que a permeabilidade das barreiras hemato-oculares é alterada mesmo antes do aparecimento de lesões irreversíveis associados a ela. Assim, esta técnica permite a detecção precoce desta patologia [7]. A fluorometria ocular abre também uma nova janela para o desenvolvimento de investigação farmacológica, pois é uma área que tem sido especialmente insuficiente por dificuldades metodológicas [1]. Prevê-se que a possibilidade de desenvolvimento de medicamentos que actuem selectivamente, modulando e diminuindo as alterações da BHR, permita também intervir na manutenção do equilíbrio ambiental da retina e na prevenção da cegueira [1].

3. Descrição do sistema de aquisição de dados

Neste capítulo vão ser descritos os componentes do sistema de aquisição de dados tanto a nível de hardware (sensor, acondicionamento de sinal, ADC, dsPIC[®], comunicação com o exterior - RS232 e USB) como a nível de software (implementada do microcontrolador e no Matlab).

3.1. Descrição do hardware

3.1.1. Sistema Óptico

O sistema óptico (figura 7) utilizado neste sistema de aquisição de dados baseia-se no sistema óptico da lâmpada de fenda (30SL-M, Zeiss, Alemanha), o mesmo utilizado no PAF. Será feita uma descrição muito superficial do sistema, pois não é parte fundamental do trabalho. Encontra-se explicado em [8].

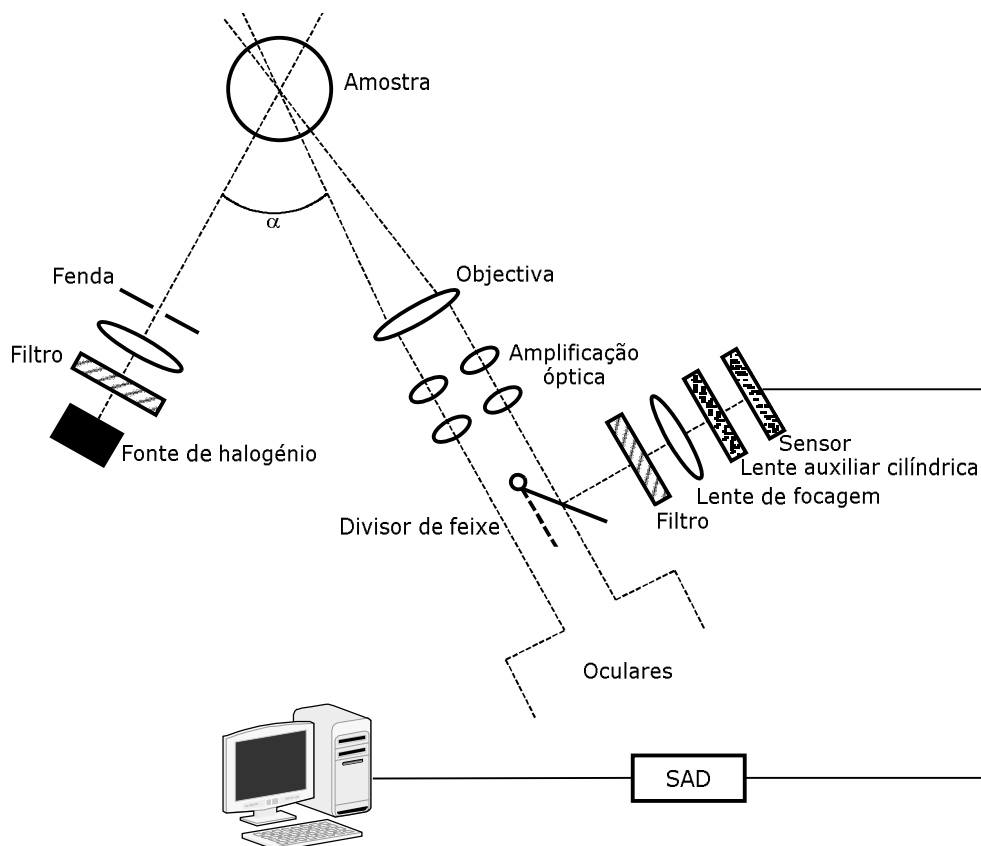


Figura 7: Sistema óptico do sistema de aquisição de dados, onde α representa o ângulo da lâmpada de fenda (Adaptado de [8]).

O SAD está acoplado à lâmpada de fenda. O sistema óptico possui uma fonte de luz de halogéneo. São usados filtros para isolar os comprimentos de onda de excitação e emissão da fluoresceína e fluorescência, respectivamente. É utilizado um divisor de feixe que possibilita a existência de dois caminhos ópticos. O primeiro conduz a luz de fluorescência para os olhos do operador, possibilitando também a focalização do objecto, o segundo encaminha a fluorescência até ao sensor de imagem. É utilizada uma lente cilíndrica que tem como principal função maximizar o tamanho da imagem e ajustá-la à área fotossensível do sensor de imagem [8].

A lâmpada de fenda possui ainda um sistema amplificador de Galileu que permite seleccionar a amplificação óptica de 5X, 8X, 12X, 20X e 30X. Na figura α representa o ângulo da lâmpada de fenda, isto é, é o ângulo em que a excitação é feita segundo o eixo óptico da objectiva. Este ângulo pode ser $\pm 90^\circ$.

3.1.2. Sensor

O sensor utilizado neste SAD é um sensor de imagem N-MOS do tipo saída em tensão da série S3621/S3924 de 128 a 1024 pixéis. A figura representa o sistema de aquisição de dados onde é realçado o sensor.

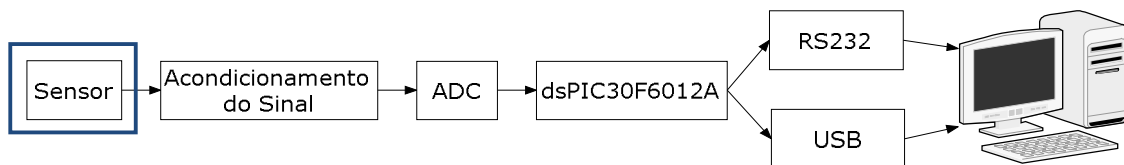


Figura 8: Diagrama de blocos do sistema de aquisição de dados, no qual é distinguido o sensor.

Este detector possui um conjunto de características entre as quais se destacam, a sua grande área fotossensível, elevada sensibilidade à radiação UV, larga gama dinâmica, excelentes linearidade e uniformidade de saída e também baixo consumo [23]. Por estas razões, este tipo de sensor é utilizado no nosso sistema de aquisição de dados.

O sensor de imagem N-MOS consiste num circuito integrado composto por uma secção fotossensível, uma secção de comutação de leitura que tem como principal função ler o sinal proveniente da área fotossensível, um registo de deslocamento e uma secção de processamento de sinal [23].

Ao contrário do método usado na maioria dos fotodíodos, método de leitura em tempo real⁶, este detector usa o método de integração da carga para leitura do seu sinal de saída. Neste método, o sinal de saída do sensor é proporcional à quantidade de luz exposta (*intensidade da luz* \times *tempo de integração*⁷). Isto permite que o sinal de saída seja aumentado utilizando tempos de integração mais longos, possibilitando a detecção de níveis de luz baixos apesar de se usarem fotodíodos com uma pequena área fotossensível [24].

- **Modo de funcionamento:**

O interruptor de endereço dos fotodíodos é activado quando aplicação um impulso externo *start*. A carga armazenada em cada um dos fotodíodos durante um determinado tempo é enviada para a linha de vídeo à medida que eles são inicializados. Quando o interruptor de leitura é desligado e a carga é descarregada. Este processo repete-se sempre que se inicializa um novo fotodíodo com um novo impulso de endereço [8].

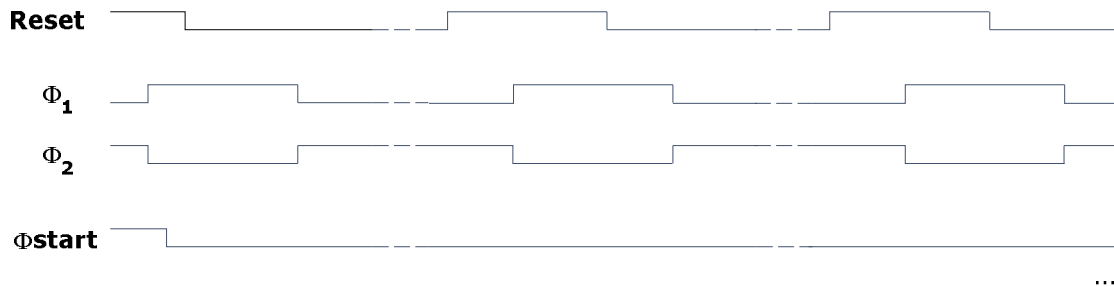


Figura 9: Diagrama temporal da aquisição de dados.

- **Características da resposta espectral**

As características da resposta espectral do sensor de imagem podem ser definidas como sendo a relação entre o comprimento de onda da luz incidente e a sensibilidade. Para que um sinal seja detectado pelo sensor, a energia da luz incidente deve ser superior ou igual à energia da banda *gap*, E_g , do silício (1,12eV, a temperatura ambiente) de modo a que os electrões originem pares electrão-lacuna ou cargas. Uma vez formados os pares electrão-lacuna, eles são difundidos até à zona de depleção

⁶ O sinal de saída do sensor é proporcional apenas à intensidade da luz incidente [25].

⁷ Corresponde ao intervalo de tempo entre cada impulso *start* de registo de deslocamento MOS.

onde são acelerados por um campo eléctrico resultando um sinal acumulado para ser lido. O silício apresenta um coeficiente de absorção da luz incidente dependente do comprimento de onda da mesma, sendo menor para comprimentos de onda mais longos. Quando o substrato é iluminado por uma luz incidente com um comprimento de onda longo, os pares electrão-lacuna são gerados em posições mais profundas. Uma vez que os pares electrão-lacuna possuem tempo de vida limitado, significa que podem difundir apenas uma certa distância, podendo ou não alcançar a zona de depleção. Assim, a contribuição para o sinal de saída varia com profundidade a que são gerados os pares electrão-lacuna ou com o comprimento de onda da luz incidente [24].

De acordo com a equação $\lambda(nm) = 1239.5/Eg(eV)$, o limite de comprimento de onda detectado é de aproximadamente $1100nm$. O sensor apresenta o pico de fotossensibilidade de aproximadamente $0,240A/W$ a $600nm$ [24].

- **Fotorresposta não uniforme**

A fotorresposta não-uniforme (Photoresponse non-uniformity, PRNU) está relacionada com a exibição de uma pequena não-uniformidade em termos de sensibilidade apresentada por cada fotodíodo do sensor de imagem quando iluminado uniformemente. Uma das suas causas é a presença de defeitos de fabrico do substrato de silício. Nos sensores N-MOS da Hamamatsu o máximo de resposta não-uniforme está compreendido em $\pm 3\%$ [24].

- **Saída no escuro (corrente no escuro)**

A corrente no escuro corresponde à saída do sensor quando este não é iluminado. “Ela é causada principalmente devido à descarga da carga armazenada em cada fotodíodo devido à corrente de recombinação dentro da camada de depleção e/ou devido à corrente de fuga de superfície” [8]. A gama de saída para a detecção de luz pode ser restringida pelo aumento da corrente no escuro, pois existe um limite superior da saída determinado pela carga de saturação. Tal como a sensibilidade, a corrente no escuro não é uniforme sendo por isso importante reduzi-la ao mínimo

possível⁸. É essencial ter especial atenção para tempos de integração elevados, pois tal como a luz incidente ela também é proporcional ao tempo de integração [24].

Um aumento da temperatura conduz um aumento do número de cargas excitadas termicamente da banda de valência para a banda de condução, levando a um aumento exponencial da corrente no escuro. Neste tipo de sensor de imagem N-MOS, a corrente duplica com um aumento de 5°C, o mesmo dizer que para um incremento de ΔT de temperatura, a corrente no escuro será vezes $(1,15)^{\Delta T}$ maior. Assim, se diminuirmos a temperatura é reduzida a corrente no escuro permitindo tempos de integração mais longos e consequentemente medições de níveis de luz mais baixos [24].

- **Resolução**

A resolução do sensor de imagem descreve a sua capacidade de discriminação e reprodução de um padrão incidente. Nos sensores de imagem NMOS da Hamamatsu, a resolução é definida pela função de transferência de modulação (MTF – *Modulation Transfer Function*). Esta função é uma representação quantitativa da relação entre a amostra e a imagem resultante [25]. A resolução do sensor de imagem é dependente do comprimento de onda, a qual piora para comprimentos de onda mais longos. Isto ocorre, pois a conversão fotoelétrica a comprimentos de onda mais longos ocorre em posições de maior profundidade dentro do substrato de silício, consequentemente a distância de difusão é maior. Deste modo, a carga gerada pode ser espalhada aos pixels adjacentes antes de alcançar a camada de depleção da junção j-n. De forma a minimizar os efeitos da deterioração da resolução a comprimentos de onda mais longos, estes sensores usam uma estrutura na qual as cargas geradas a posições mais profundas dentro do substrato são capturadas pelo substrato [24].

- **LAG**

O LAG é um fenómeno que se baseia no facto de parte do sinal já lido persistir no próximo varrimento. É causado pela inicialização incompleta dos fotodíodos e aumenta para tempos de leitura muito curtos [8,24]. Está também associado ao facto

⁸ O sinal de saída do detector pode ser processado a fim de subtrair a corrente no escuro a cada pixel.

do sinal de leitura não conseguir seguir uma mudança abrupta da luz incidente levando à degradação da exactidão do sinal em relação ao tempo. O LAG diminui exponencialmente com o aumento do tempo de *reset*, e é menor que 0,1% para um tempo *reset* de 2,5 μ s [24].

- **Ruído**

O ruído presente nos sensores de imagem N-MOS está dividido em grosso modo em ruído de padrão fixo (inclui o ruído de transitórios e a corrente no escuro) e ruído aleatório (presente no sensor de imagem e circuito de leitura). A grandeza ruído de padrão fixo é constante, podendo ser subtraída a cada pixel por processamento de sinal. Por outro lado, o ruído aleatório é devido a flutuações erróneas da tensão e pelas corrente e carga eléctricas. Quando subtraído o ruído de padrão fixo, o ruído aleatório determina o limite de detecção mínimo de sinal de luz detectado pelo sensor de luz ou o limite da gama dinâmica.

O ruído aleatório pode ser dividido em seis tipos diferentes:

- a) Flutuações aleatórias da corrente no escuro;
- b) Ruído de *reset* do fotodíodo;
- c) Ruído de *reset* da linha de vídeo;
- d) Ruído da corrente do circuito de leitura;
- e) Ruído da tensão do circuito de leitura;
- f) Ruído *Johnson* das resistências usadas no amplificador inversor do circuito de leitura.

sendo as fontes de ruído d), f) e c) dominantes.

O limite superior da gama dinâmica é determinado pela carga de saturação de saída enquanto o limite inferior depende da carga equivalente ao nível de ruído. Assim, a gama dinâmica é da ordem de 10^4 , correspondendo uma resolução de 15bits [24].

- **Características da frequência do registo de deslocamento**

O registo de deslocamento do sensor de imagem N-MOS é composto por transístores N-canál MOS e funcionam quando lhe é aplicado os impulsos Φ_{start} (Φ_{st}), Φ_1 e Φ_2 . Para o funcionamento do registo de deslocamento é exigida uma amplitude

mínima ao impulso de relógio a qual depende da frequência de operação. Assim, o máximo da frequência de operação é determinado pela amplitude do impulso de relógio. A frequência de operação máxima para o tipo de sensor utilizado neste SAD é de 2MHz para uma amplitude do impulso de relógio de 5V. Não existe um limite mínimo para a frequência de operação, há apenas um limite mínimo da saturação e/ou p balanço da corrente no escuro [8, 24].

- **Mudança característica pela exposição UV**

O detector tende a deteriorar-se depois com a exposição contínua de radiação UV. Esta degradação ocorre devido à quebra das ligações Si e H, O ou OH no interface Si-SiO₂ quando submetido a radiação UV de alta energia. Isto provoca um aumento da corrente no escuro e uma diminuição da sensibilidade. Isto é particularmente notório para comprimentos de onda mais pequenos, pois são absorvidos mais à superfície do substracto [24].

- **Precauções a ter com o sensor NMOS**

Quando se usa este tipo de detector, é necessário tomar algumas precauções, nomeadamente o estabelecimento do tempo de integração, estimativa da saída do sensor, fontes de luz, exactidão posicional da área fotossensível, precauções a nível da sua manipulação e configuração do circuito externo. Só irão ser desenvolvidos os dois pontos iniciais [24].

No estabelecimento do tempo de integração deve-se ter em conta diversos factores: intensidade da luz incidente, tempo de leitura e nível da corrente no escuro, os quais afectam os seus limites máximo e mínimo. Não é possível ler um sinal de carga quando este excede a carga de saída de saturação. Como dito anteriormente, o sinal de saída correspondente à corrente no escuro é proporcional ao produto entre o sinal da corrente no escuro e o tempo de integração. Assim, um aumento da corrente no escuro restringe a gama de detecção da luz, pois a gama de saturação de carga é constante. O tempo de integração é determinado pela frequência de leitura e pelo número de pixéis [24].

Quando ao segundo aspecto, se conhecermos a intensidade da luz incidente e o seu comprimento de onda podemos determinar a resposta do detector (carga de

saída) recorrendo à resposta espectral do sensor. Como a carga de saída do sensor é proporcional ao tempo de integração, a partir dela é possível determiná-lo [24].

3.1.3. Acondicionamento de Sinal

O bloco de acondicionamento de sinal (figura 10) tem como principal objectivo amplificar e ajustar a amplitude do sinal de saída do sensor de imagem à entrada do ADC.

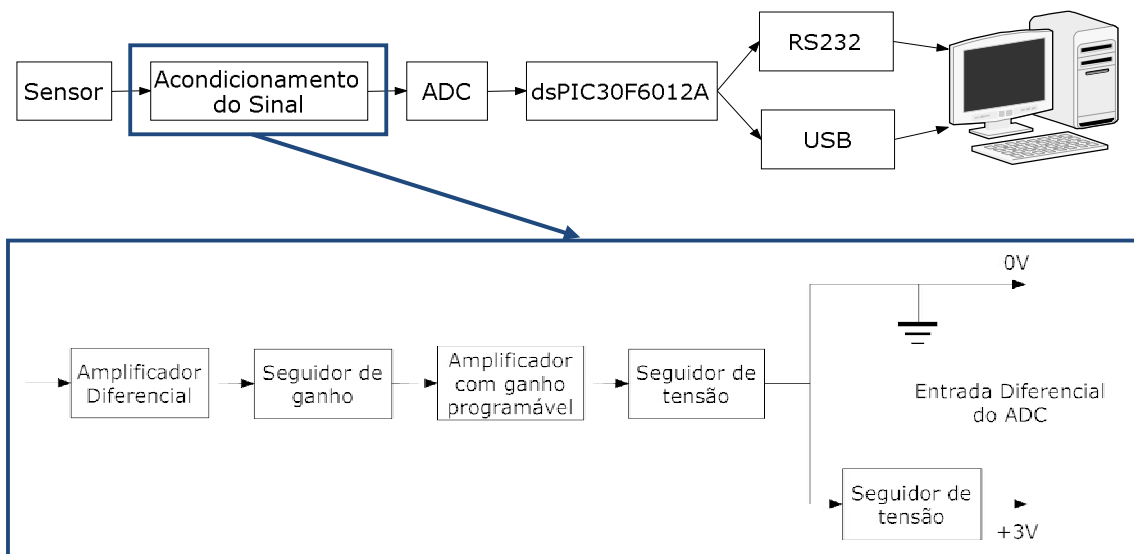


Figura 10: Diagrama de blocos do acondicionamento do sinal.

O sinal de saída do sensor de imagem do sistema de aquisição de dados possui uma polaridade negativa (invertido) e inclui um *offset* DC de aproximadamente 1V quando a tensão *reset* V é de 2,5V. Para remover o *offset* DC e inverter o sinal de modo a ficar com polaridade positiva, é colocado à saída do sensor um amplificador operacional somador inversor (ganho dado por $-R_{21}/R_{22}$, Apêndice B) e cuja entrada positiva é ajustada através do potenciômetro para remoção o *offset* DC.

De seguida, é colocado um amplificador operacional seguidor de ganho, que tem como principal funcionalidade amplificar o sinal de saída do amplificador operacional anterior. O valor do ganho deste amplificador pode ser variado com a variação da resistência do potenciômetro (R32 – Apêndice B).

3. Descrição do hardware sistema de aquisição de dados

Depois destes, encontra-se um amplificador de ganho programável (PGA – *Programmable Gain Amplifier*), o AD526. O ganho deste amplificador é controlado pelo microcontrolador, e é útil para amplificação de níveis de luz baixos. Ele possui 5 definições de ganho binário, desde 1 até 16 (1, 2, 4, 8 e 16), é alimentado por $\pm 15V$, possui uma gama de saída de $\pm 10V$, tem um erro máximo no ganho e de não-linearidade de 0,02% e 0,001% respectivamente [26].

Seguidamente encontra-se um amplificador operacional seguidor de tensão. A tensão de saída deste amplificador operacional (VoAGC) é conduzida para a entrada de um outro amplificador operacional seguidor de tensão, cuja saída origina a tensão entrada positiva para o ADC. Quanto à tensão de entrada negativa do ADC ela é de 0V.

3.1.4. ADC

Neste módulo são descritas as principais características do ADC utilizado no sistema de aquisição de dados.

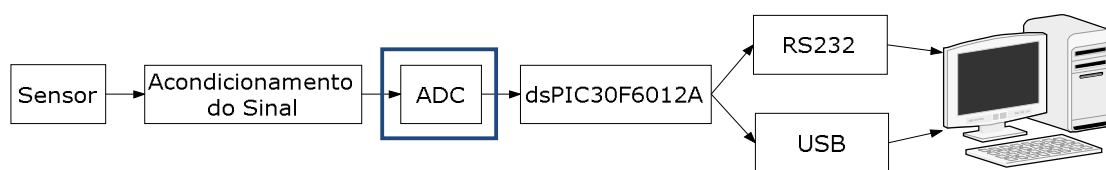


Figura 11: Diagrama de blocos do sistema de aquisição de dados, onde é realçado o ADC.

Apesar de o microcontrolador possuir um ADC interno⁹, é utilizado para a conversão analógico-digital um ADC externo (ADS1601, Texas Instruments, Texas), pois este possui uma maior resolução e uma maior taxa de amostragem.

Principais características do ADC (ADS1601, Texas Instruments, Texas) [27]:

- Entrada diferencial de $\pm 3V$ (contudo no sistema de aquisição de dados AINN (tensão de entrada negativa) de 0V e AINP (tensão de entrada positiva) de +3V);
- Arquitectura delta-sigma;
- Taxa de amostragem: 1.25 MSPS (sample per second)
- Interface série 3-wire;

⁹ Taxa de amostragem de 200Ksps e resolução de 12bits.

- Largura de banda: 615kHz;
- Tensão de alimentação (analógica e digital): +5V e +5V respectivamente.
- Resolução de 16bits.

No SAD são usados apenas 15bits da resolução do ADC.

3.1.5. Microcontrolador dsPIC (dsPIC30F6012A, Microchip Technology, EUA)

O microcontrolador consiste num pequeno computador programável num único chip [28]. Este dispositivo contém no mesmo invólucro uma unidade de processamento central (CPU), memória para armazenamento de dados e programa, linhas de E/S (Entrada/Saída), portos de comunicação, temporizadores e por vezes periféricos como conversores A/D (Analógico/Digital) e D/A (Digital/Analógico), entre outros. A presença de todos elementos num espaço reduzido, a sua versatilidade, baixo custo e consumo, está a inovar o modo de como os circuitos electrónicos são projectados permitindo também a projecção de circuitos que anteriormente eram demasiado complexos, poupando principalmente tempo e espaço [29].

Actualmente, existe uma grande variedade de microcontroladores disponíveis no mercado para melhor se adaptarem às exigências dos diferentes projectos. Existem mais de doze empresas em todo o mundo a fabricar e comercializar estes dispositivos [28]. Irei focar-me apenas nos microcontroladores dsPIC[®] da *Microchip Technology*. O dsPIC[®] consiste num controlador de sinais digitais (DSC) de 16 bits com arquitectura *Harvard* modificada que combina as melhores características dos microcontroladores de 16 bits com o óptimo desempenho dos processadores de sinais digitais (DSP - *Digital Signal Processors*) [30].

A escolha do microcontrolador a utilizar recai sobre inúmeros aspectos, entre os quais: o número de entradas digitais e analógicas, saídas requeridas pelo sistema, tamanho das memórias, interrupções, temporizadores. A tabela mostra as principais características do microcontrolador utilizados neste SAD.

Tabela 1: Características gerais do microcontrolador (dsPIC30F6012A, Microchip Technology, EUA) [31, 32].

	dsPIC30F6012A
Velocidade CPU (MIPs)	30
Memórias	
Memória FLASH (Kbytes)	144
Memória RAM (bytes)	8192
Memória EEPROM (bytes)	4096
Periféricos	
Portos I/O	52
ADC 12-bit (200Ksps)	16 canais
Temporizadores 16-bit/32-bit	5 – 16bit 2 – 32bit
Módulo SPI	2
Módulo UART	2
Número de pinos	64

3.1.5.1. Recursos

Irão ser descritos os principais recursos do microcontrolador empregue no SAD. Não serão descritos de forma muito exaustiva, pois toda a informação encontra-se detalhadamente em [32].

3.1.5.1.1. Osciladores

O oscilador é o elemento responsável pelo estabelecimento do ritmo de processamento do processador. Quanto maior foi a frequência do dispositivo, mais rápida será a execução das tarefas consequentemente, maior será o desempenho do processador [33]. O dispositivo utilizado suporta uma frequência máxima de 120MHz.

Podemos dividir os osciladores em três categorias distintas: recurso a um cristal externo, oscilador externo ressonante e oscilador interno. Quanto aos cristais

externos, eles podem ser denominados de XT (4MHz a10MHz) e HS (10MHz a25MHz). Existe um multiplicador de relógio, designado por PLL (*Phase Locked Loop*), o qual multiplica a frequência do oscilador por um factor previamente estabelecido. Há ainda um divisor de relógio o qual divide a frequência por um factor previamente configurado. A outra forma é a introdução de um oscilador externo ressonante ou um composto por uma resistência e um condensador (RC). Finalmente, pode-se recorrer à utilização de um oscilador interno composto por dois tipos, um oscilador de baixo consumo (LPRC) e um oscilador rápido, de elevado consumo (FRC). Para além destes, existem ainda dois outros recursos ao relógio, o *Fail-Safe Clock Monitor* (FSCM) que é responsável pela monitorização do sistema do oscilador e um outro responsável pela alternância de oscilador [33].

No nosso SAD estão instalados dois osciladores de cristal externos com frequência de 32,768KHz e 7,37 MHz.

3.1.5.1.2. Low Voltage Detect (LVD)

Este módulo tem como principal funcionalidade monitorizar a alimentação, muito utilizado em instrumentos que possuem baterias [31]. À medida que a energia se gasta, verifica-se uma diminuição gradual da tensão. Este módulo utiliza uma tensão de referência interna previamente definida que é comparada com a tensão externa e com a tensão seleccionada. Quando a tensão de referência iguala a tensão previamente seleccionada, é gerada uma interrupção para a execução dos procedimentos *shutdown*. Estes procedimentos devem ser executados até que a tensão de referência atinja a tensão mínima de funcionamento do componente [31, 32, 33].

Apesar do nosso SAD não possuir baterias, este módulo está activo, tendo sido definida uma tensão de referência de 2,6V.

3.1.5.1.3. Reset

O mecanismo de *reset* é responsável por colocar o dispositivo num estado conhecido, isto é, reinicia o sistema [34]. Este evento é gerado quando aplicado o sinal de *reset* por um nível lógico baixo [29], podendo ser desencadeado por oito procedimentos diferentes. São destacados os seguintes:

3. Descrição do hardware sistema de aquisição de dados

a) POR (*Power-on Reset*)

Quando o SAD é iniciado, o POR desencadeia um evento *reset* para que este só entre em funcionamento quando a fonte de alimentação estabilizar, evitando assim picos de tensão [32, 29].

b) EXTR (*External Reset*)

O evento EXTR é desencadeado quando aplicado de um valor lógico baixo ao pino *Master Clear* (\overline{MCLR}) [32].

c) SWR (*Software Reset Instruction*)

Este evento é nativo do processador, e sempre que ele é executado, é desencadeado o evento de *reset*, o qual termina no próximo ciclo de relógio. Este evento não reinicia o sistema oscilador [33].

d) WDTR: Watchdog Time-out Reset

Esta forma de *reset* é gerada sempre que haja uma paragem da contagem do tempo. No sistema em estudo, este módulo está desactivado.

e) BOR: Programmable Brown-out Reset

O módulo BOR é responsável por desencadear um evento *reset* quando o valor da tensão de alimentação desce abaixo de um certo limite permitido. Este módulo recorre a um circuito interno de referência, a qual é comparada com a tensão de alimentação, podendo ser configurada a 2,0V, 2,7V, 4,2V e 4,5V [32]. No nosso SAD, este módulo está desactivado.

3.1.5.1.4. Interrupções

Uma interrupção baseia-se num mecanismo inerente ao microcontrolador, a qual suspende e desvia a execução do programa para um subprograma, designado por rotina de atendimento da interrupção. Quando esta rotina for concluída, o dispositivo retoma a execução no ponto em que a deixou. São várias as interrupções permitidas pelo microcontrolador, as quais estão definidas em pormenor em [32].

3.1.5.1.5. Watchdog Timer (WDT)

O módulo *Watchdog Timer* (que em português significa “Cão de Guarda”) tem como principal finalidade originar um evento *reset* a quaisquer erros de execução do *software* [34]. Ele verifica se o programa funciona correctamente com uma frequência previamente definida, e caso ocorra *overflow* do seu contador ou que haja uma paragem na contagem do tempo ele desencadeia um evento *reset*. Na aplicação em estudo, este módulo está desactivado [29].

3.1.5.1.6. Temporizadores (Timers)

Os temporizadores são componentes que funcionam como contadores de tempo. O microcontrolador possui temporizadores de 16bits, sendo possível a sua combinação, formando pares de temporizadores de 32bits. O contador é constantemente incrementado até 65 535 e 4 294 967 295 para temporizadores de 16bits 32bits, respectivamente. Quando é atingido o seu valor máximo, recomeça a contagem a partir do zero [29, 32, 33].

O microcontrolador utilizado possui cinco temporizadores (*Timer 1*, *Timer 2*, *Timer 3*, *Timer 4* e *Timer 5*) que podem ser classificados em três tipos diferentes de acordo com as suas diferenças funcionais, tipo A, tipo B e Tipo C [32, 33].

O dsPIC® possui um *Timer* do tipo A, designado por *Timer 1*. Nas categorias do tipo B e C fazem parte os temporizadores 2 e 4 e os temporizadores 3 e 5, respectivamente. Estes temporizadores possibilitam a sua concatenação inter-categorias, formando um temporizador de 32 bits [32, 33].

Para que os temporizadores possam ser utilizados é necessário definir o seu modo de funcionamento, que pode ser: modo *timer*, modo *timer* com relógio externo rápido, modo contador síncrono com relógio externo, modo contador assíncrono com relógioexterno, modo bloqueado de acumulação de tempo [33].

3.1.5.1.7. Memórias

O microcontrolador utilizado no sistema de aquisição de dados possui memória de programa (FLASH), memória de dados (RAM) e também memória de armazenamento (EEPROM).

3. Descrição do hardware sistema de aquisição de dados

A memória de programa (FLASH) permite guardar o *software* implementado no microcontrolador, a qual pode ser reprogramada, tornando-se assim adequada para o desenvolvimento de aplicações. Esta memória é não-volátil, isto é, tem a capacidade de manter os seus dados na ausência de alimentação. Deste modo, o sistema mantém o *software* armazenado internamente, sem a necessidade de o gravar a cada execução [29, 33].

A memória RAM (*Random Access Memory*) consiste na memória usada pelo programa durante a sua execução [29]. Enquanto a execução do programa, esta memória armazena os dados temporários e resultados intermédios. É uma memória volátil, isto é, perde os seus dados devido a uma falha de alimentação [29, 33].

A memória EEPROM (*Electrically Erasable Programmable Read-Only Memory*) é não-volátil, tendo como principal finalidade guardar dados importantes quando a alimentação é desligada, permitindo também a sua gravação e leitura.

3.1.5.1.8. Comunicação com o exterior

A comunicação entre o computador e o sistema de aquisição de dados pode ser feita através da interface RS-232 (*Recommended Standard 232*) ou USB (*Universal Serial Bus*). Será abordado de seguida de forma mais exaustiva o modo de funcionamento da interface RS-232 pois foi a utilizada durante todo o trabalho.

3.1.5.1.8.1. Interface RS-232

O microcontrolador incorpora um módulo UART (*Universal Asynchronous Receiver/Transmitter*). Este módulo tem como principal finalidade promover a comunicação série assíncrona entre o computador e o sistema de aquisição de dados utilizando duas vias de transferência de dados, a de recepção (RX) e a de transmissão (TX). Estas duas vias possibilitam a comunicação em ambas as direcções simultaneamente, conhecido por *full-duplex*.

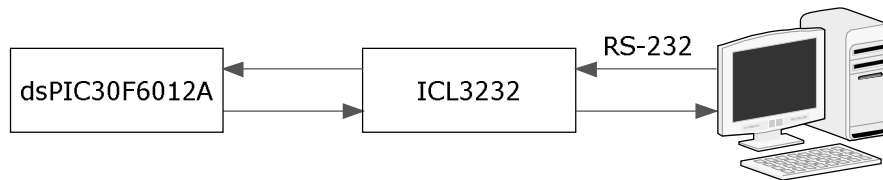


Figura 12: Diagrama de blocos da interface RS-232.

O modo de transmissão assíncrona (figura 13) permite que os dados sejam transmitidos de forma sucessiva sem o envio do sinal de relógio ao receptor. Quando o transmissor inicia o processo de transmissão de dados, coloca a via TX num nível lógico baixo, durante o tempo de duração de um *bit*¹⁰, correspondente ao *start bit*. Esta mensagem é percebida pelo receptor, sendo se seguida enviados os bits de dados, bit de paridade (opcional) e por último o bit de paragem de modo a garantir que o a via TX volte ao seu estado inicial. A ordem de transmissão ocorre do LSB para o MSB [35].

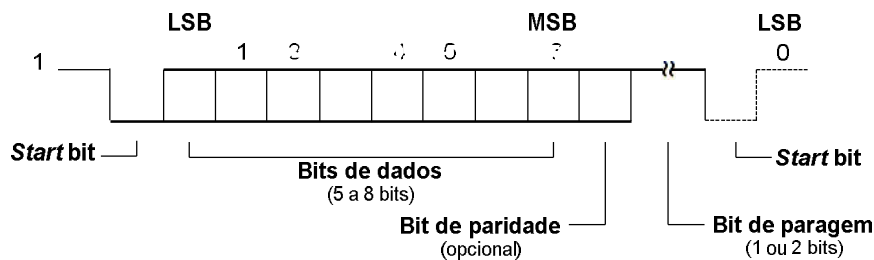


Figura 13: Transmissão série assíncrona (Adaptado de [36]).

Para que a comunicação funcione correctamente, é necessário que haja concordância dos parâmetros de configuração de ambos os lados (computador e SAD).

Os parâmetros de configuração da interface RS-232 são os seguintes¹¹:

- Velocidade de transmissão: 115200 bits/s
- *Bits* de dados: 8
- *Bits* de paridade: nenhum
- *Bits* de paragem: 1
- Controlo de fluxo: nenhum

¹⁰ Corresponde ao inverso da velocidade de transmissão da interface RS-232.

¹¹ Ver significado dos parâmetros de configuração em Apêndice A.

3. Descrição do hardware sistema de aquisição de dados

A interface RS-232 requer conectores específicos, com 25 ou 9 pinos. O conector utilizado possui 9 pinos e é designado por DB-9. A figura 14 mostra a ligação entre os dois conectores (macho e fêmea). É de indicar que apenas os pinos de transmissão, recepção e terra estão interconectados pois não há controlo de fluxo.

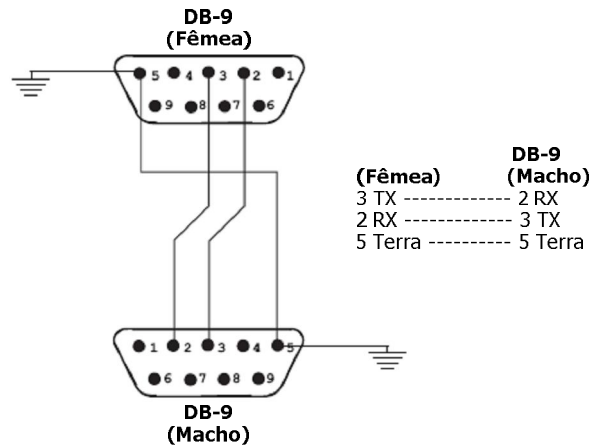


Figura 14: Ligação entre os conectores DB-9 (fêmea) e DB-9 (macho) sem controlo de fluxo¹² (Adaptado de [37]).

Os níveis do módulo UART e do protocolo RS-232 não são compatíveis. Assim, foi introduzido entre o microcontrolador e computador uma *driver* RS-232 (ICL3232). Esta *driver* tem como principal função gerar a partir de uma fonte de alimentação TTL de +5Volt os níveis de tensão e polaridades requeridas pela interface RS-232 [37]. No caso de computador não possuir a interface RS-232 é possível utilizar um adaptador USB-Série¹³.

O módulo UART é constituído por três componentes principais (figura 15), que são elas:

- Módulo de configuração da taxa de transferência;
- Módulo de transmissão;
- Módulo de recepção.

¹² Significado dos pinos em secção A.1.

¹³ Por exemplo o adaptador PL-2303 USB-Serial *Driver*.

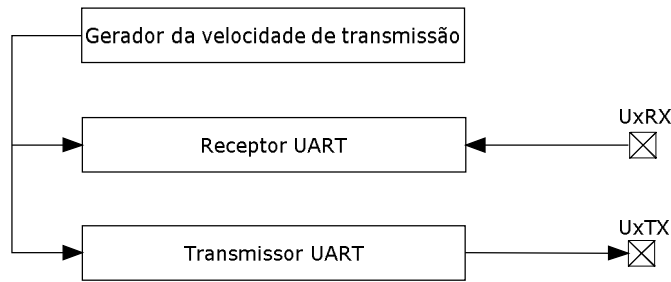


Figura 15: Diagrama do módulo UART (Adaptado de [31]).

O módulo de configuração da taxa de transferência (*Baud Rate Generator* - BRG) tem como finalidade gerar a taxa de transmissão a que se vai dar a comunicação entre o computador e SAD. Este módulo possui 16bits e o valor (inteiro) da taxa é calculado do seguinte modo:

$$UxBRG = \frac{\text{Frequência do cristal(Hz)}}{16 * \text{Velocidade de transmissão}} - 1$$

No nosso SAD, a frequência do cristal (FCY) é de aproximadamente 7.37MHz em que existe a opção PLL (*Phase Locked Loop*) de x16 em que vai multiplicar a frequência do oscilador por 16. Posteriormente esse valor é dividido por 4 resultando numa frequência de oscilador de aproximadamente 30MHz. O facto do valor de *UxBRG* ter de ser inteiro (15 no nosso caso), pode incorrer-se erro no cálculo da velocidade de transferência. Assim, no nosso caso, para uma velocidade de transferência de 115200bps e uma frequência do oscilador de 30MHz incorre-se um erro de +1.9% [32].

No módulo de transmissão, a função responsável pela transmissão de dados é a *Send_String()*. Quanto ao módulo de recepção, a função implementada responsável por receber as strings é a *handle_string()*.

3.1.5.1.8.2. Interface USB

A comunicação com o SAD pode também ser efectuada recorrendo à interface USB (figura 16), na qual é utilizado o segundo modo do módulo UART. Para que se possa estabelecer tal ligação é necessário introduzir um *chipset*, FT232BM, no qual o

3. Descrição do hardware sistema de aquisição de dados

protocolo¹⁴ USB está incorporado. A velocidade da interface USB está condicionada com a velocidade que foi definida pela porta série, isto é, de 115200bits/s.

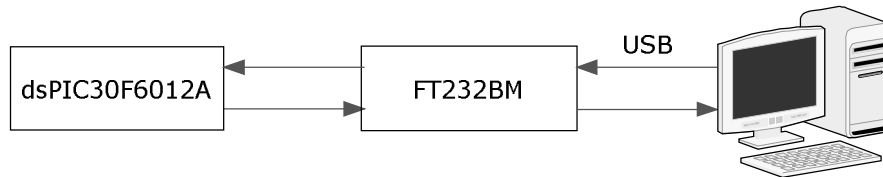


Figura 16: Diagrama de blocos da interface USB.

O conector utilizado na comunicação pode ser da série “A” ou “B”, sendo o último o utilizado no SAD. (figura 17).

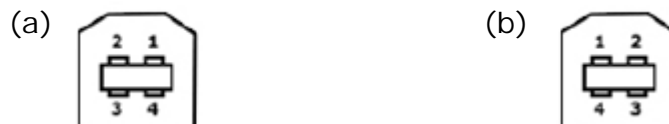


Figura 17: Conector USB da série B. (a) Conector fêmea, (b) Conector macho. Descrição dos pinos: 1:Vcc, 2: D-, 3:D+ e 4:Terra (Adaptado de [38]).

O conector possui 4 fios condutores, dois (pinos 1 e 4) são responsáveis pelo transporte de energia e os outros dois (pinos 2 e 3) são responsáveis pela transferência de dados, os quais estão entrelaçados de forma a minimizar as interferências [37].

A interface USB pode trabalhar em dois modos distintos: *Bus-powered* e *Self-powered*. O nosso sistema trabalha com o modo *Self-powered*. Neste modo, o SAD possui a sua própria fonte de alimentação de +5V (não necessita da energia fornecida pela porta à qual está conectado) que está conectada ao pino 14 da componente FT232BM [38]. É de notar também a presença da resistência R46 de 1500Ω (Apêndice B) que tem como principal função detectar a conexão ou remoção de um dispositivo, conhecido por tecnologia *pull and play* [38].

¹⁴ O protocolo encontra-se descrito por exemplo em [39.]

3.1.5.1.8.3. Escolha do interface de comunicação com o computador:

Ambas as portas de comunicação com o exterior apresentam vantagens e desvantagens. Optou-se pela utilização da porta série RS232 pois é uma forma de comunicação muito simples e permitiu a utilização do *HyperTerminal*, muitas vezes utilizado ao longo do trabalho desenvolvido.

3.1.5.1.9. Módulo SPI™ (*Serial Peripheral Interface*)

O módulo SPI consiste num mecanismo de comunicação série síncrono de elevada velocidade entre periféricos. O microcontrolador fornece dois módulos SPI no mesmo dispositivo. No nosso sistema, ele é utilizado na comunicação entre o microcontrolador e o ADC externo. A transmissão e recepção são realizadas no modo de 16-bit. O microcontrolador opera em modo *slave*, sendo o ADS1601 o *master*, o qual origina os sinais FSO e SCLK. A comunicação entre os dois dispositivos começa com a sincronização feita pelo microcontrolador. O ADC reconhece o sinal SYNC e a transferência é inicializada se este tiver um nível lógico elevado pelo menos para um período de relógio. O sinal FSO gerado pelo ADS1601 indica que os dados podem ser lidos o qual é conectado ao pino FSR do microcontrolador. O ADS1601 gera também o sinal CLKR para assegurar que a continuação da sincronização dos dados com o relógio. O sinal *Dout* contém os dados de saída do ADS1601 [28, 32, 40].

3.1.6. Fonte de alimentação:

A rede eléctrica nacional apresenta-se sob a forma de corrente alternada (*alternative current*, AC) sinusoidal de 230V (valor eficaz¹⁵) tendo uma frequência de 50Hz. Esta corrente pode ser aplicada directamente em alguns equipamentos, contudo, existem outros que necessitam que corrente contínua (*direct current*, DC) que é o caso do nosso sistema de aquisição de dados. Deste modo, é essencial que o SAD possua um determinado circuito de forma a obter-se corrente contínua a partir da

¹⁵ Valor eficaz ou rms (*root mean square*) que no caso de grandezas sinusoidais alternadas é $\sqrt{2}$ vezes menor que o valor máximo, independente da frequência.

corrente alternada. Este circuito é designado por fonte de alimentação [41, 42]. As figuras 18 e 19 representam os diagramas de blocos que compõem a fonte de alimentação utilizada no sistema de aquisição de dados.

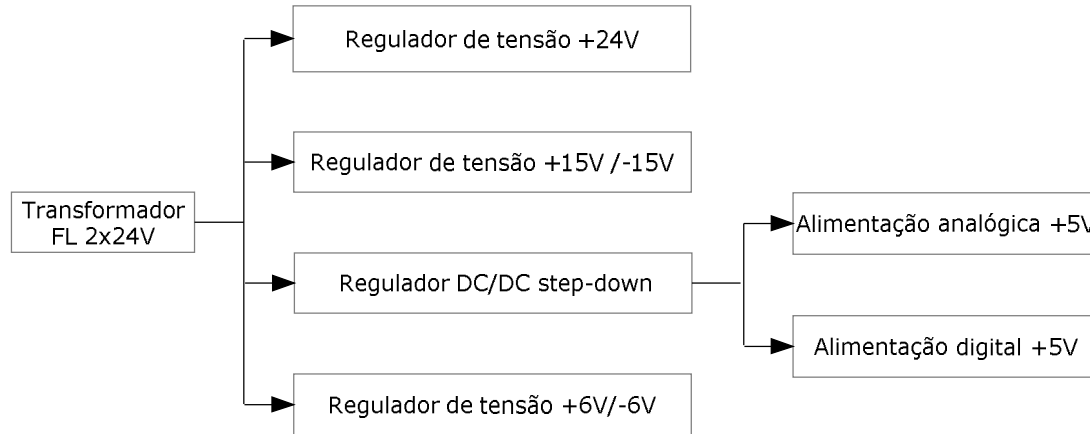


Figura 18: Diagrama de blocos da fonte de alimentação.

A fonte de alimentação possui um transformador, FL 52/24, com tensão de saída de 2x24V e potência 52 VA, pontes rectificadoras e filtros de modo a transformar a corrente alternada em corrente contínua a níveis que melhor se adaptam aos requeridos pelo sistema de aquisição de dados.

As tensões de alimentação de +24V, +15V, -15V, +6V e -6V são geradas a partir de reguladores de tensão específicos. Já o regulador DC-DC *Step down* ajustável é utilizado para converter a tensão de saída do transformador em 8V e de seguida são utilizados dois reguladores de tensão de +5V para as alimentações referentes às partes digital e analógica do circuito.

O módulo representado na figura 19 serve exclusivamente para gerar as alimentações de referência necessárias para a conversão analógico-digital.

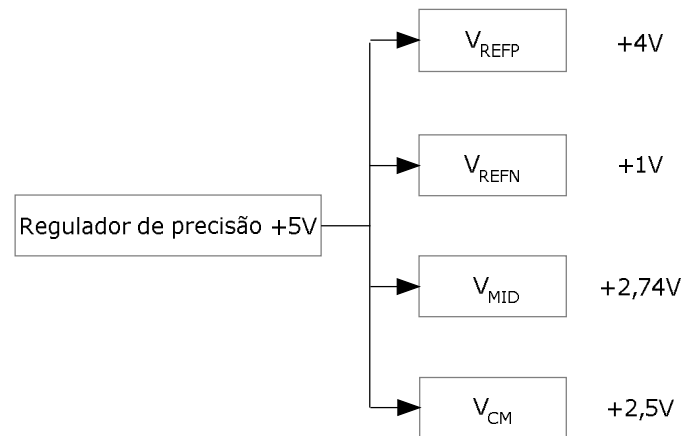


Figura 19: Diagrama de blocos do gerador de tensão de referência.

É utilizado um regulador de +5V, de precisão 0,2% (máximo). Este regulador é ideal para conversores analógico-digital (A/D) pois possui uma corrente de fuga muito baixa (1mA), excelente estabilidade à temperatura, baixo ruído, excelente regulação linear e da carga, potência baixa e baixo custo. A partir da tensão originada por este regulador de tensão são geradas as tensões V_{REFP} , V_{REFN} (ajustáveis $\pm 200\text{mV}$), V_{MID} e V_{CM} , sendo as duas últimas tensões fixas.

4. Descrição do Software

4.1. Ferramentas de desenvolvimento

4.1.1. MPLAB[®] IDE:

O MATLAB[®] IDE (*Integrated Development Environment*) consiste numa ferramenta de ambiente de desenvolvimento integrado que pode ser obtida gratuitamente no sítio da *Microchip* (www.microchip.com). Neste trabalho foi utilizada a versão MPLAB[®] IDE v7.50. Esta ferramenta permite escrever código fonte, compilar e por fim simular tanto em ambiente de desenvolvimento integrado como directamente no componente (designado por *debugger In Circuit*) [43]. Para tal, é utilizado um programador e depurador ICD 2, produzido igualmente pela *Microchip Technology*.

A figura 20 representa o modo ligação do ICD 2 ao computador e ao SAD. A conexão entre o ICD 2 e o computador pode ser feita de duas formas distintas, através de RS-232 ou USB, sendo a última a mais comum e no nosso caso a utilizada. Já entre o ICD 2 e o sistema de aquisição de dados, a ligação é feita através de um conector RJ-12 [43].

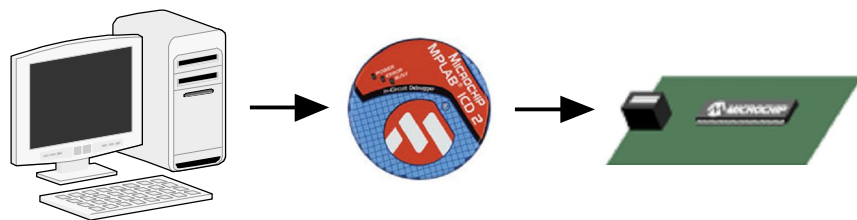


Figura 20: Conexão entre o computador, ICD 2 sistema de aquisição de dados. (adaptado de [43])

Este ambiente de desenvolvimento suporta apenas linguagem *Assembly*. Para que se possa utilizar linguagem C é necessário instalar um compilador que funciona em conjunto com o MPLAB[®] IDE. O compilador utilizado foi o MPLAB[®] C30.

4.1.2. MATLAB:

A ferramenta de desenvolvimento MATLAB foi utilizada para a criação de uma interface de comunicação entre o computador e o sistema de aquisição de dados. Neste trabalho foi utilizada a versão MATLAB R2007a.

4.1.3. Hyperterminal:

Podendo não ser considerada uma ferramenta de desenvolvimento, o *HyperTerminal* consiste num *software* do *Windows XP* no qual o estabelecimento da comunicação entre o SAD e o computador pode ser "testado".

4.2. Software implementado no microcontrolador:

A figura 21 representa o fluxograma que traduz o modo de funcionamento do *software* implementado no microcontrolador.

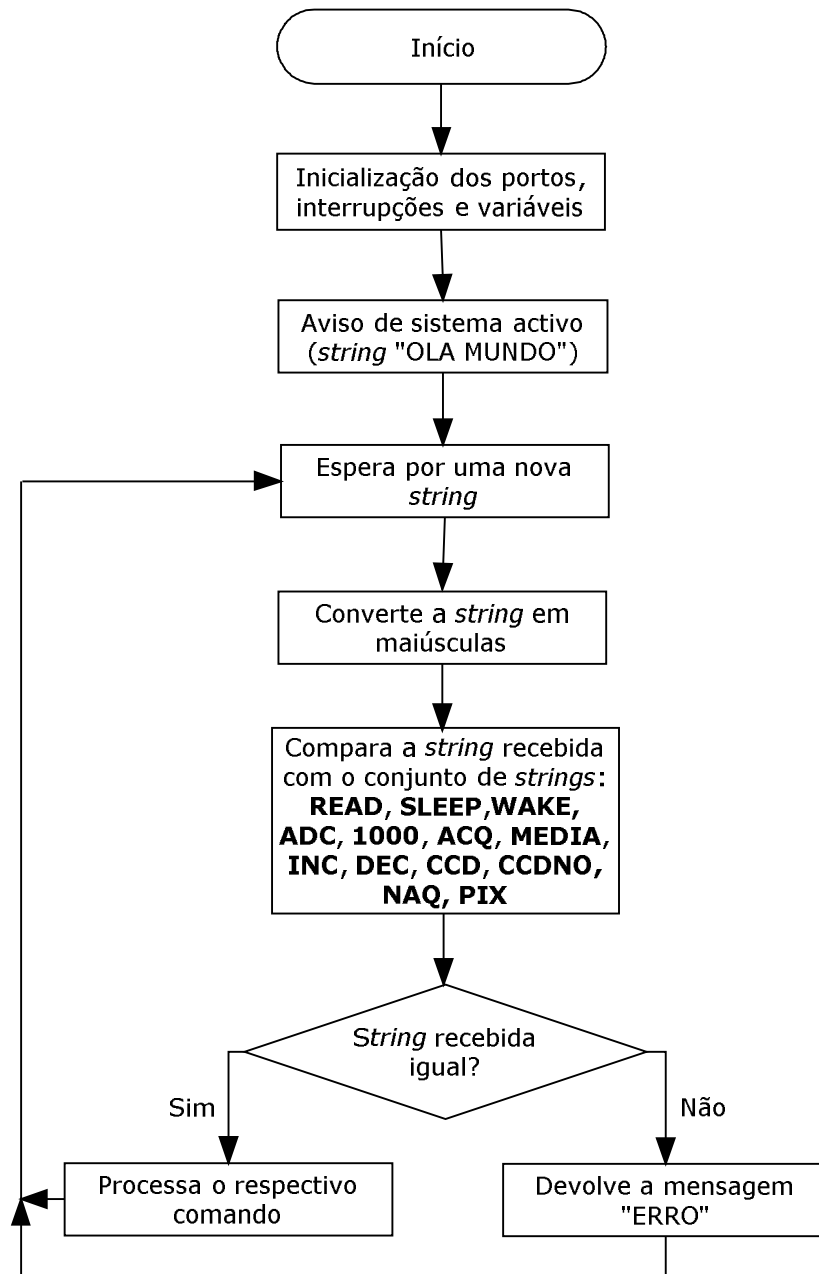


Figura 21: Fluxograma representativo do *software* desenvolvido.

4.2.1. Descrição dos comandos

São vários os comandos implementados no microcontrolador utilizado no SAD, os quais irão ser descritos de seguida.

Na tabela 3 apresenta de forma sucinta as funções de cada um dos comandos implementados no microcontrolador.

Tabela 2: Descrição dos comandos implementados do microcontrolador.

Comando	Função
WAKE	Coloca o processador a <i>full-power</i> (elevado consumo de energia).
SLEEP	Coloca o processador a baixo consumo de energia.
READ	Permite saber se ocorreu ou não <i>overflow</i> do ADC.
CCD	Lê os pixéis do sensor de imagem.
CCNO	Lê os pixéis do sensor de imagem.
MEDIA	Devolve 2000 valores da saída do sensor de imagem, em que cada um resulta da média de 16.
ACQ	Devolve 2048 valores da saída do ADC, pressionando o interruptor S1 antes e depois da aquisição desses valores.
DEC	Diminui o ganho do amplificador AD526.
INC	Incrementa o ganho do amplificador AD526.
ADC	Devolve as tensões em vários pontos do sistema de aquisição de dados.
NAQ	Permite seleccionar o número de médias a fazer por pixel durante a leitura do sensor.
PIX	Possibilita a escolha da largura (duração) de cada pixel durante a aquisição.
1000	Devolve 2048 valores da saída do ADC.

4.2.1.1. Comando NAQ

O comando NAQ possibilita a escolha do número de médias a fazer por pixel durante a leitura do sensor de imagem. Por defeito o número de médias a fazer por pixel é 1000.

4.2.1.2. Comando PIX

Este comando permite inserir a largura de pixel que se pretende que ele possua durante a aquisição dos dados do sensor de imagem. Por defeito este valor é 440. A duração do pixel será igual à multiplicação do tempo de cada ciclo de instrução (34ns) pelo número previamente escolhido no comando PIX.

4.2.1.3. Comando ADC

O microcontrolador possui um ADC interno de até 16 canais de entrada cujas características principais são 200ksps e resolução de 12bits. Ele não é utilizado na conversão dos dados adquiridos pelo sensor de imagem, mas sim os seus canais são utilizados para fornecer as tensões em vários pontos do sistema de aquisição de dados. A figura 22 mostra a saída tipo do comando ADC e na tabela 4 estão descritos as tensões a que se referem cada um dos números.

ADC PIC -> 0 = 0.391; 1 = 0.000; 2 = 1.923; 3 = 2.428; 4 = 3.965; 5 = 0.981; 6 = 0.000; 7 = 0.000; 8 = 0.000;

Figura 22: Saída do comando ADC.

Tabela 3: Descrição da saída do comando ADC.

Pino do dsPIC®	Saída		Índice no comando
16	V_{amp}	Saída do 2º amplificador (figura 10)	0
15	V_{oAGC}	Saída do 4º amplificador (figura 10)	1
14	V_{CM}	Tensão de entrada de modo comum	2
13	V_{MID}	Tensão do ponto médio	3
12	V_{REFP}	Tensão de referência positiva	4
11	V_{REFN}	Tensão de referência negativa	5
17	RB6	Não está ligado	6
18	RB7	Não está ligado	7
21	V_{AGC}	Saída do PGA	8

4.2.1.4. Comando DEC

Este comando tem como finalidade diminuir o ganho do amplificador de ganho programável e processa-se segundo o diagrama da figura 23.

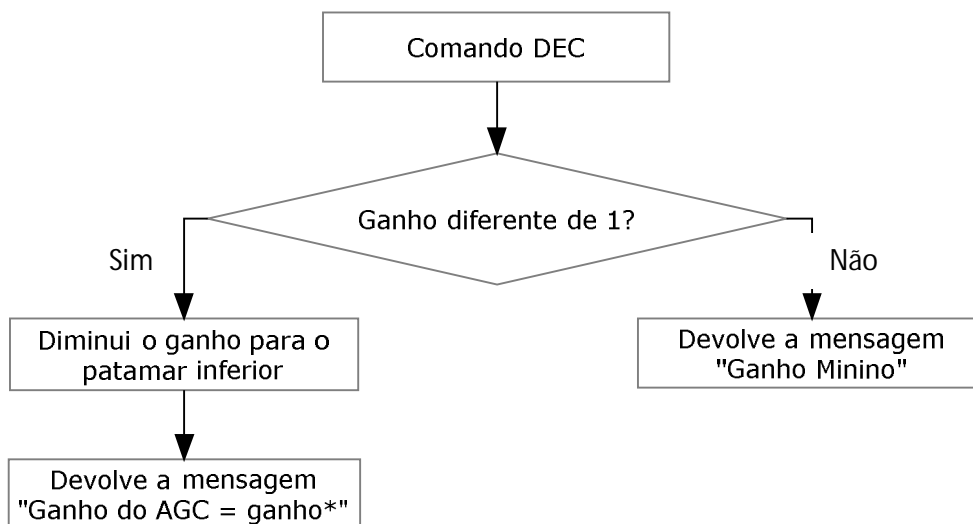


Figura 23: Diagrama do comando DEC (*Ganho poderá ser 1, 2, 3 ou 4, que corresponde a um ganho do amplificador de ganho programável de 1, 2, 4 ou 8).

4.2.1.5. Comando INC

O comando INC permite incrementar o ganho do amplificador de ganho programável. O seu modo de funcionamento está representado da figura 24.

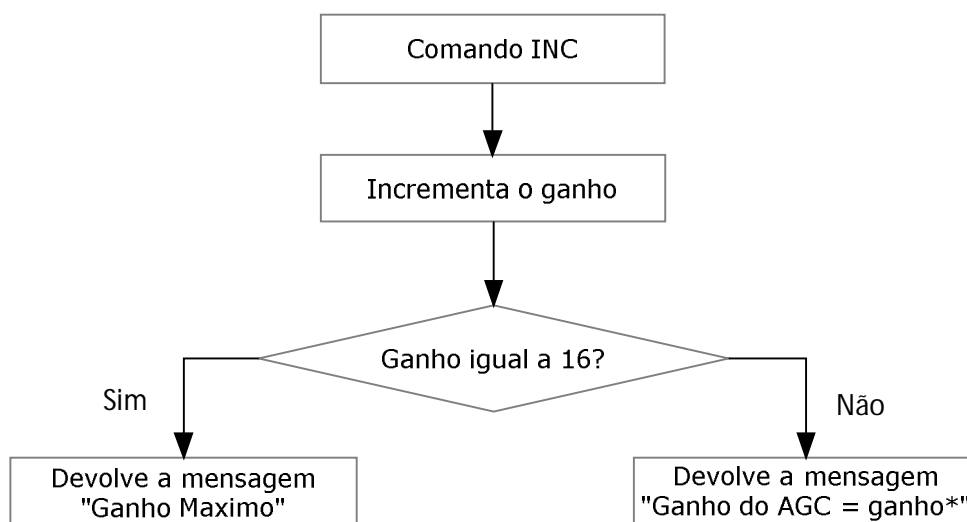


Figura 24: Diagrama do comando INC (*Ganho poderá ser 2, 3, 4 ou 5, que corresponde a um ganho no amplificador de ganho programável de 2, 4, 8 ou 16).

4.2.1.6. Comando READ

Este comando permite ler o valor à saída do porto SPI (saída do ADC) e coloca-o na porta série, permitindo depois saber se ocorreu ou não *overflow* do ADC.

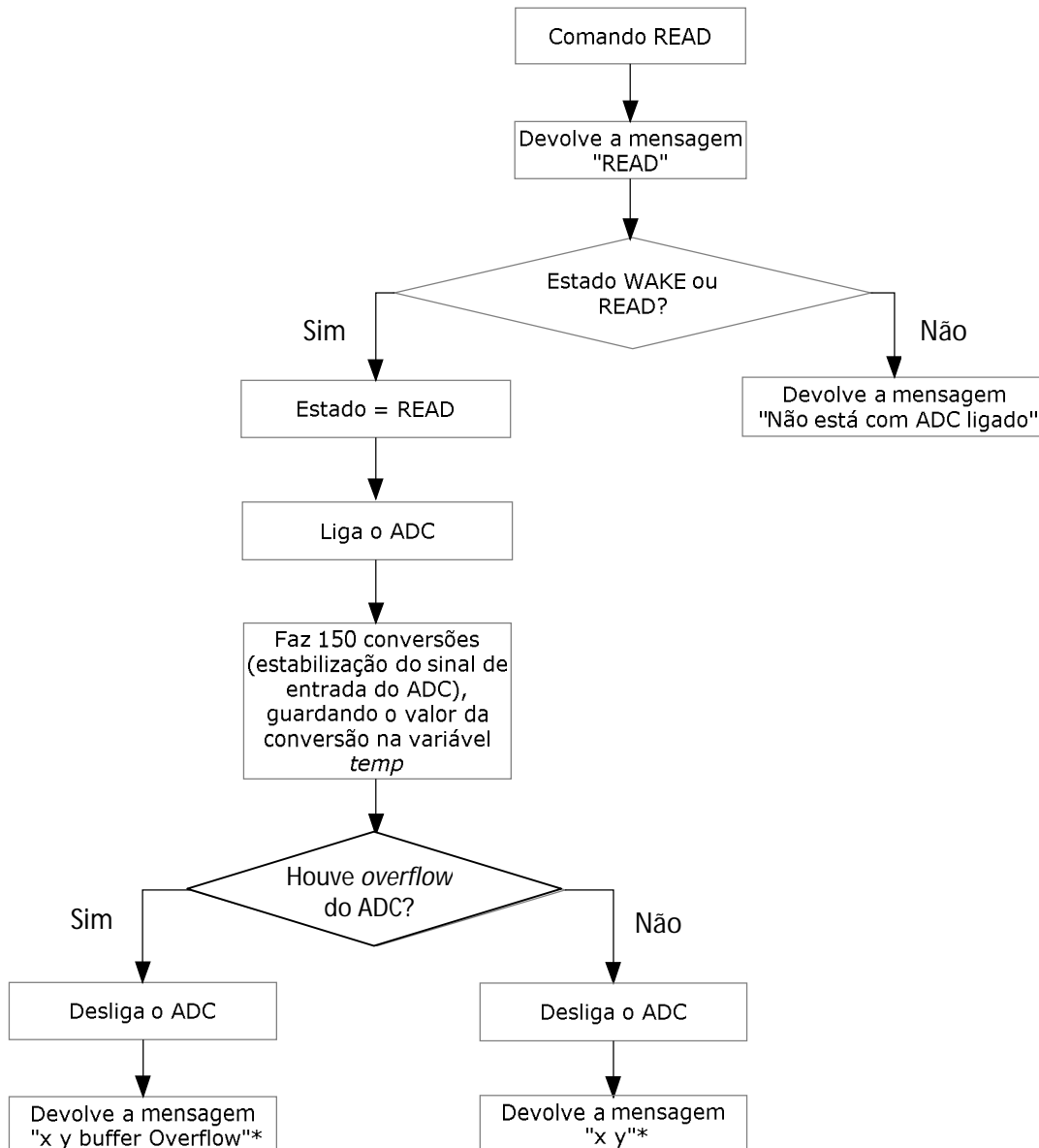


Figura 25: Diagrama representativo do comando READ (*x* e *y* correspondem aos valores da variável *temp* no modo *signed* e *unsigned*, respectivamente).

4.2.1.7. Comando WAKE:

Este comando tem como função colocar o processador a full-power (elevado consumo de energia) e processa-se segundo a figura 26.

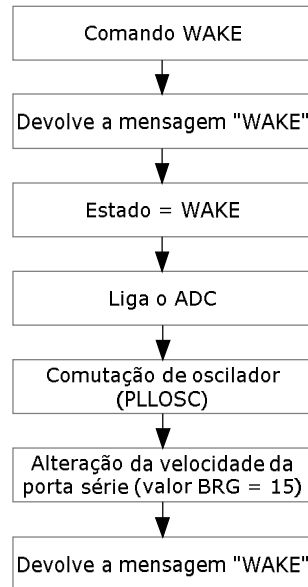


Figura 26: Diagrama do comando WAKE.

4.2.1.8. Comando SLEEP:

Este comando tem como função colocar o processador a baixo consumo, processando-se como demonstra a figura 27.

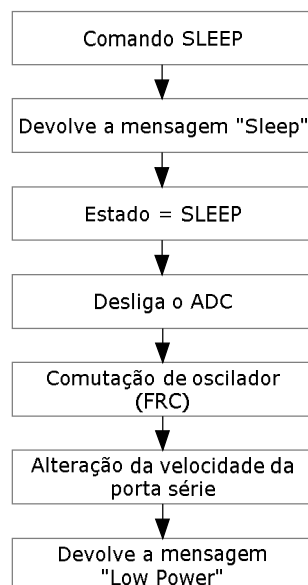


Figura 27: Diagrama do comando SLEEP.

4.2.1.9. Comando 1000 e ACQ:

A figura 28 representa os comandos ACQ e 1000. Quando executado o comando ACQ, este leva à execução do comando NO_SERIAL.

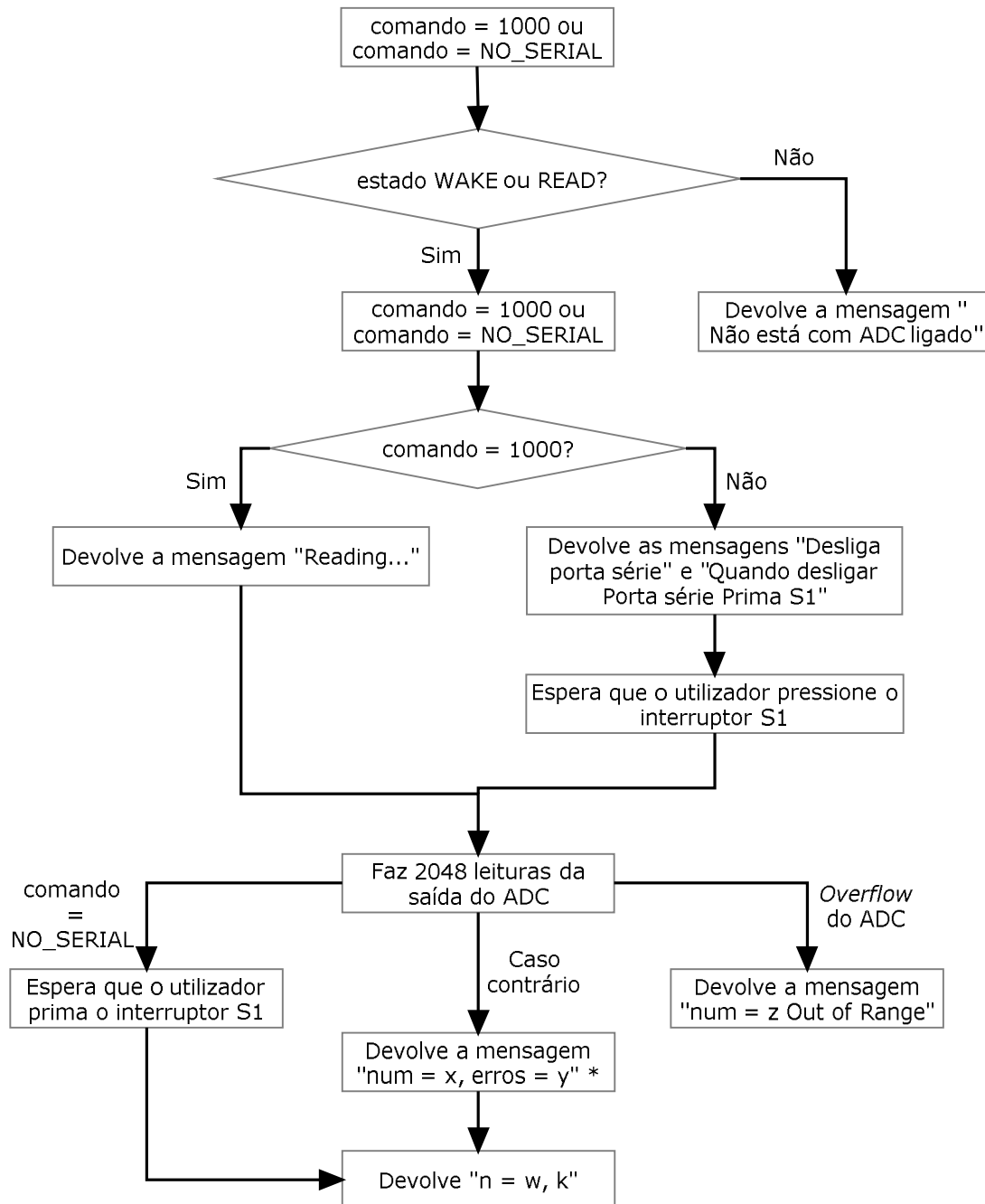


Figura 28: Comandos 1000 e ACQ (* x corresponde a 2048 e y a 0).

4.2.1.10. Comando MEDIA:

O comando MEDIA está representado na figura 29.

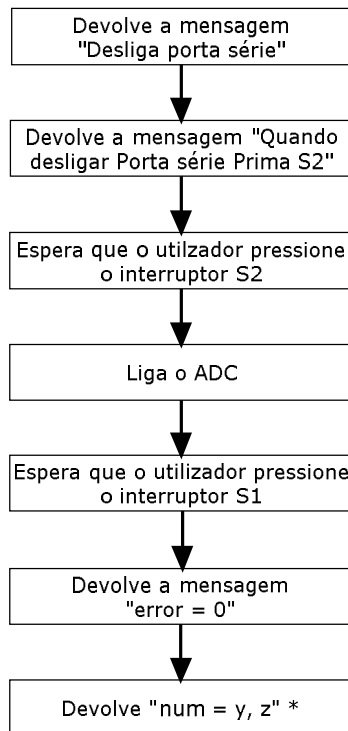


Figura 29: Comando MEDIA (y corresponde ao número da iteração (0 a 1999) e z o correspondente valor da saída do ADC resultante da média de 16 aquisições).

4.2.1.11. Comando CCD:

Este comando tem como finalidade ler os dados do sensor de imagem, o qual está representado na figura 30.

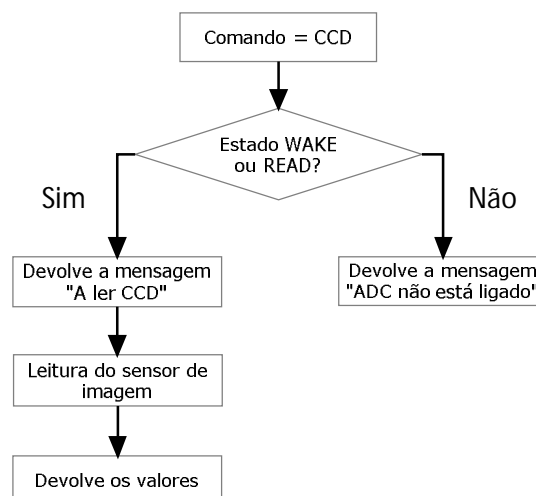


Figura 30: Esquema representativo do comando CCD.

A leitura do sensor de imagem é feita recorrendo à função *Read_CCD_2()*. Nesta função, é inicializada a sequência dos vários impulsos representada no diagrama temporal do sensor de imagem (ver secção 3.1.2.). Depois de toda uma sequência inicial, isto é, antes da aquisição dos valores de cada pixel propriamente dita, é inicializada uma interrupção que define a duração¹⁶ do pixel independentemente do número de médias que se façam por pixel. Depois de ler todos os valores, eles são escritos na porta série.

4.2.1.12. Comando CCDNO:

Este comando funciona de modo semelhante ao comando CCD, isto é, permite também ler o sensor de imagem (*Read_CCD_1()*). Porém, não permite escolher o número de leituras a fazer por pixel assim como a duração/largura de cada pixel. O comando faz quatro médias por pixel e a duração de cada pixel é o tempo efectivo, isto é, será aproximadamente quatro vezes o tempo de conversão ($4 \times 800\text{ns}$).

4.3. MATLAB:

Neste subcapítulo é apresentada a aplicação de interacção do SAD com o utilizador desenvolvida em Matlab. Serão descritas as janelas de aquisição, de pós-aquisição, todos os menus disponíveis em ambas, assim como as principais funções do próprio Matlab utilizadas.

A janela de aquisição está representada na figura 31. O processo de aquisição realiza-se do seguinte modo:

1. **Configuração e inicialização da porta série** (*menu Ficheiro* → *Iniciação*).
2. **Configuração dos parâmetros de aquisição** (*menu Configuração* → *Parâmetros*).
3. **Iniciação da aquisição** (*Iniciar Aquisição* (janela principal)).

¹⁶ Ver comando PIX.

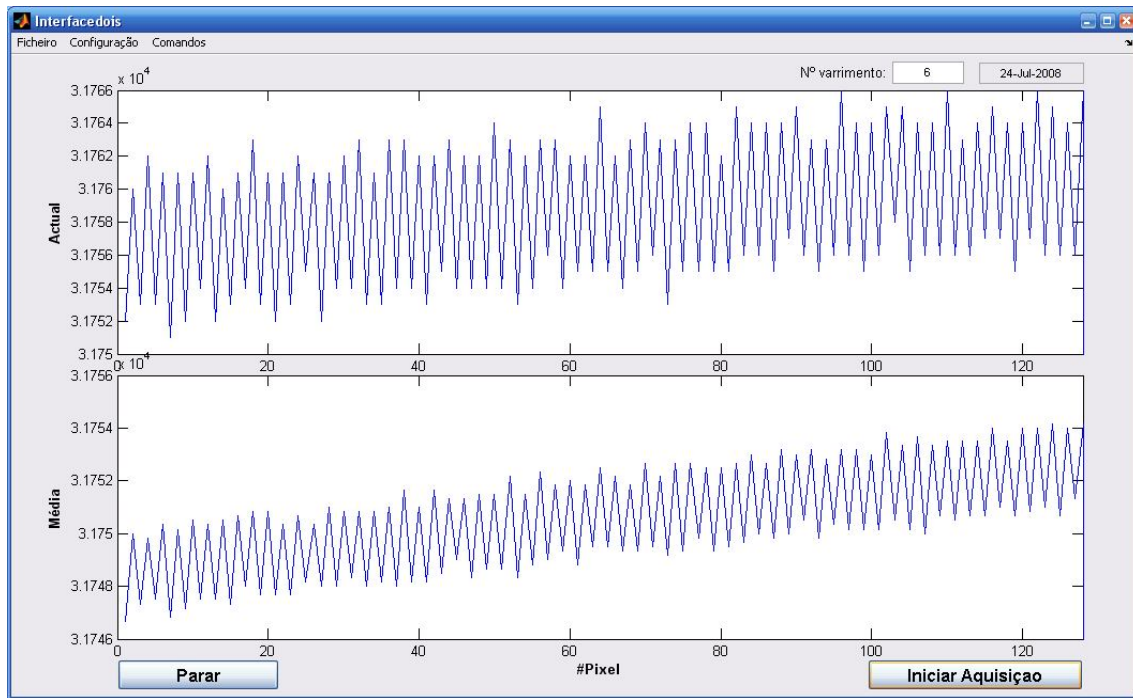
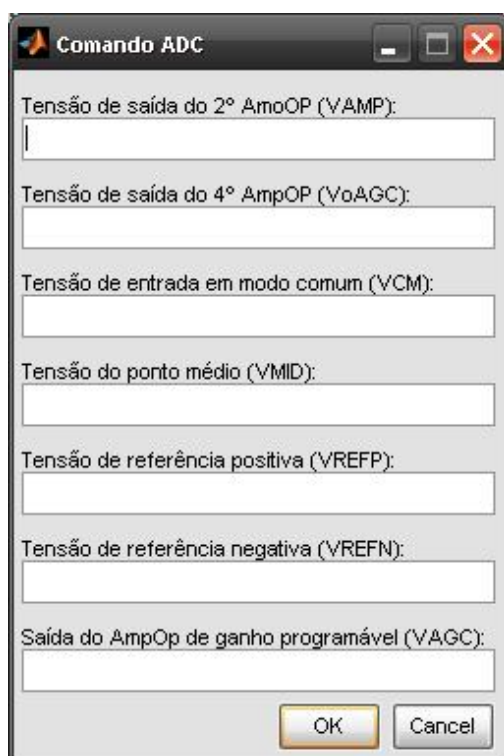


Figura 31: Janela de aquisição.

A janela de aquisição apresenta duas áreas onde os dados adquiridos são representados. Na área superior são apresentados os dados do varrimento actual, enquanto na área inferior são esboçados os dados resultantes da média dos varrimentos efectuados até ao momento. A aquisição de dados é controlada pela função `timer()`. Nesta, é indicada a função que se pretende executar (`Adquirir_dados()`), é definido o intervalo de tempo entre execuções sucessivas da mesma, é também especificado o número de vezes a executar a função (número de varrimentos) e por fim o seu modo de execução que especifica apenas o momento a partir do qual começa a contagem do intervalo de tempo entre as sucessivas execuções da função. A contagem do tempo entre as execuções consecutivas de `Adquirir_dados()` começa imediatamente depois da função ser chamada. A função `timer()` pode ser interrompida a qualquer momento, para isso basta pressionar o botão Parar (figura 31).

É também permitido a execução dos comandos *WAKE*, *SLEEP*, *ADC*, *INC* e *DEC* (*menu* Comandos). Quando executado o comando *ADC* é devolvida a janela representada da figura 32, em que nos seus campos são preenchidos pelos respectivos valores de tensão (V). Aquando a execução dos comandos *DEC* e *INC*, é devolvida uma caixa de diálogo onde é apresentada a mensagem devolvida pelo sistema



A janela intitulada "Comando ADC" apresenta sete campos de entrada para configuração de tensões e uma opção de saída. Os campos são:

- Tensão de saída do 2º AmpOP (VAMP):
- Tensão de saída do 4º AmpOP (VoAGC):
- Tensão de entrada em modo comum (VCM):
- Tensão do ponto médio (VMID):
- Tensão de referência positiva (VREFP):
- Tensão de referência negativa (VREFN):
- Saída do AmpOp de ganho programável (VAGC):

Na base da janela, há dois botões: "OK" e "Cancel".

Figura 32: Janela relativa à implementação do comando ADC.

Para além disso, os dados poderão ser guardados para posterior visualização e análise. Os dados são guardados em dois ficheiros (com o mesmo nome) distintos. Os dados adquiridos pelo detector são guardados num ficheiro *.xls, enquanto que os valores dos parâmetros de configuração utilizados na respectiva aquisição são guardados num ficheiro *.mat. Para a visualização dos dados já guardados, é aberta uma nova janela (figura 24).

Na janela representada na figura 33 permite a configuração dos parâmetros da aquisição que são eles: o número de médias a fazer por pixel, tempo de exposição, número de varrimentos, largura de pixel e por fim a concentração utilizada na medição (realizaram-se apenas medições *in vitro*). Basta realçar apenas a questão da inserção da largura do impulso do pixel. Quando introduzido o valor na respectiva caixa de texto, esse valor é dividido em níveis. O valor no nível 5 será o valor inserido na caixa de texto editável, no nível 4 será 4/5 do valor inserido e assim sucessivamente até ao nível 1 que corresponde a 1/5 do valor inserido da caixa de texto editável.

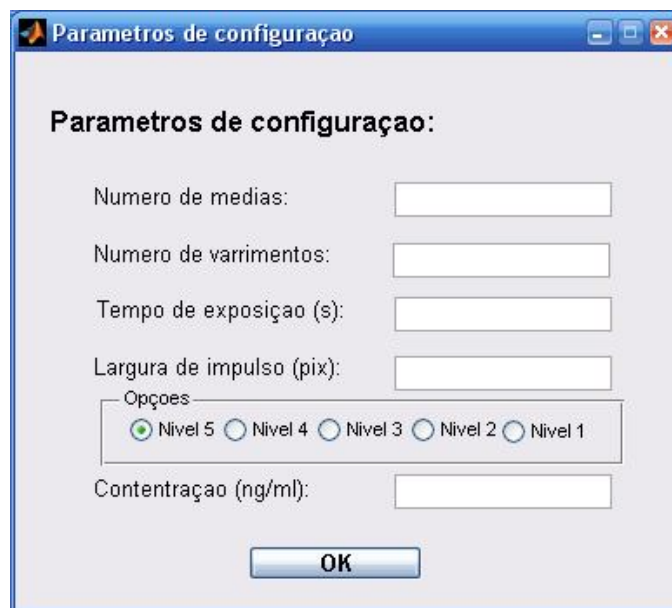


Figura 33: Janela de configuração dos parâmetros de aquisição.

A janela de pós-aquisição (figura 34), tal como a de aquisição possui duas áreas de representação dos dados adquiridos para o mesmo fim. Quando é aberto um ficheiro *.xls é também aberto o ficheiro *.mat. Os dados do primeiro varrimento são colocados em ambas as áreas (superior e inferior) e os valores das variáveis contidas no ficheiro *.mat são colocados nas respectivas caixas de texto.

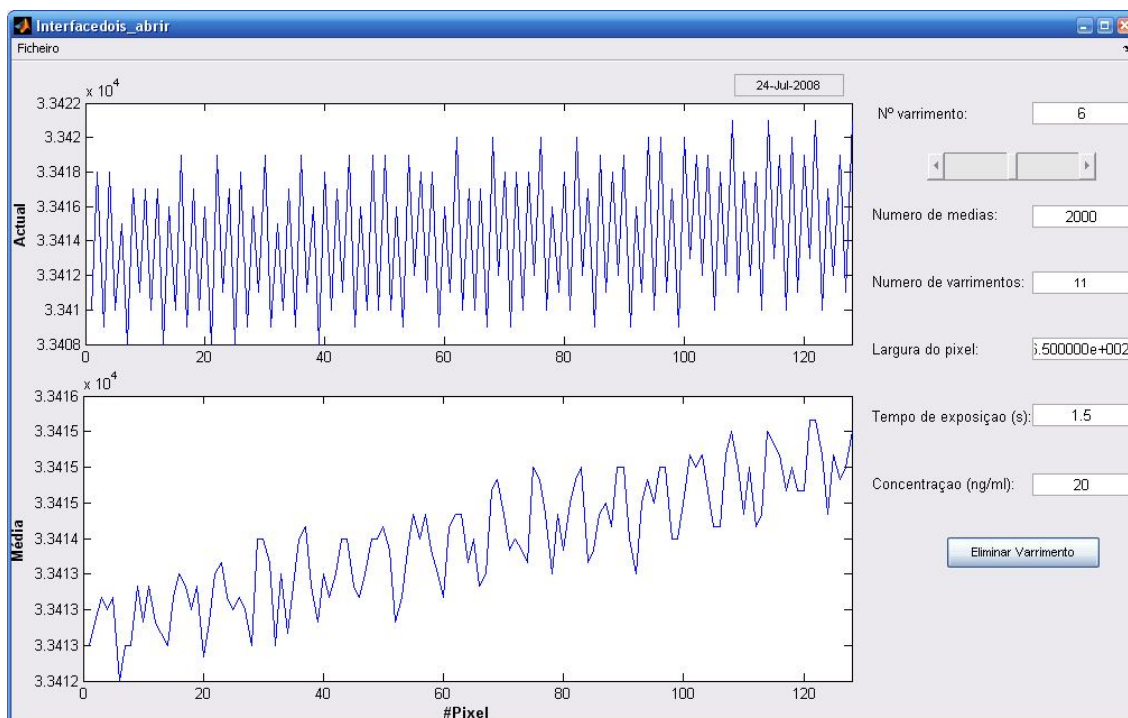


Figura 34: Janela de pós-aquisição.

O *slider* permite percorrer todos os varrimentos efectuados onde por cima de si existe uma caixa onde é apresentado o número de varrimento que se está a visualizar. Qualquer varrimento poderá ser eliminado, e caso sejam feitas essas alterações, elas poderão ser guardadas.

Como dito anteriormente, o sinal de entrada do ADC varia de -3V a +3V, que na saída correspondem a 32768 e 32767 unidades de ADC, respectivamente. De forma a tornar a saída do ADC contínua, foram adicionadas 32768 unidades de ADC ao intervalo $[0, 32767]$, enquanto no intervalo $[32768, 0[$ foram subtraídas 32768 unidades de ADC (tabela 2).

Tabela 4: Modificação da saída do ADC.

Sinal de entrada do ADC	Saída do ADC	Gama de saída modificada
+3V	32767	65 535
0	0	32768
-3V	32768	0

4.4. Envio dos comandos:

4.4.1. *HyperTerminal*

Aquando a execução dos comandos no *HyperTerminal*, para os comandos excepto o NAQ e o PIX, basta escrever o nome do comando que se pretende seguido de *Enter*. O comando é então enviado sendo posteriormente devolvida a respectiva resposta. Para os comandos PIX e NAQ, seguido dos seus três caracteres é introduzido o valor que se pretende atribuir ao número de médias a fazer por pixel durante a aquisição e à largura de cada pixel, respectivamente (exemplo: NAQ1000, PIX440). Depois disto, é então pressionada a tecla *Enter* para que o comando seja enviado para o SAD.

4.4.2. *Matlab*:

Em Matlab, o envio dos comandos NAQ e PIX funcionam de modo distinto dos restantes. Para estes dois comandos, na respectiva caixa de texto editável é

introduzido o valor que se pretende dar ao número de médias a fazer por pixel (exemplo: 1000) e a largura do mesmo, respectivamente. Este valor será concatenado da seguinte forma (igual para o comando PIX) `NAQ+1000+\n\r`, sendo `\n\r` correspondente ao *Enter*. Seguidamente é aberto um ficheiro *.txt para escrita, onde a concatenação anterior é gravada sendo se seguida fechado. Posteriormente, esse ficheiro é aberto para leitura, é lido o ficheiro e é escrito na porta série através da função *fprintf()*. A resposta do comando é lida através da função *fscanf()*. Para os restantes comandos utilizados na aplicação em Matlab, foi criada uma estrutura em que os seus campos correspondem aos comandos, os quais estão logicamente associados a um determinado valor. Este valor equivale ao comando escrito em inteiros *signed* (exemplo: ccd equivale a [99 99 100 10 13], em que 10 e 13 corresponde a `\n` e `\r` respectivamente).

.

5. Resultados obtidos e Discussão

Neste capítulo serão mostrados os resultados obtidos com o sistema de aquisição de dados. Foi determinado para dois sensores, a recta de calibração e o nível mínimo de detecção. Para além disso verificou-se o funcionamento do amplificador de ganho programável.

5.1. Ganho do amplificador de ganho programável

Como exemplo de teste efectuado ao *hardware* e de forma a confirmar o funcionamento do amplificador de ganho programável, foi introduzido à entrada do SAD um sinal de onda quadrada com uma frequência de 11Hz com amplitude e *offset* adequados, gerado por um gerador de sinal e fez-se variar o ganho do amplificador.

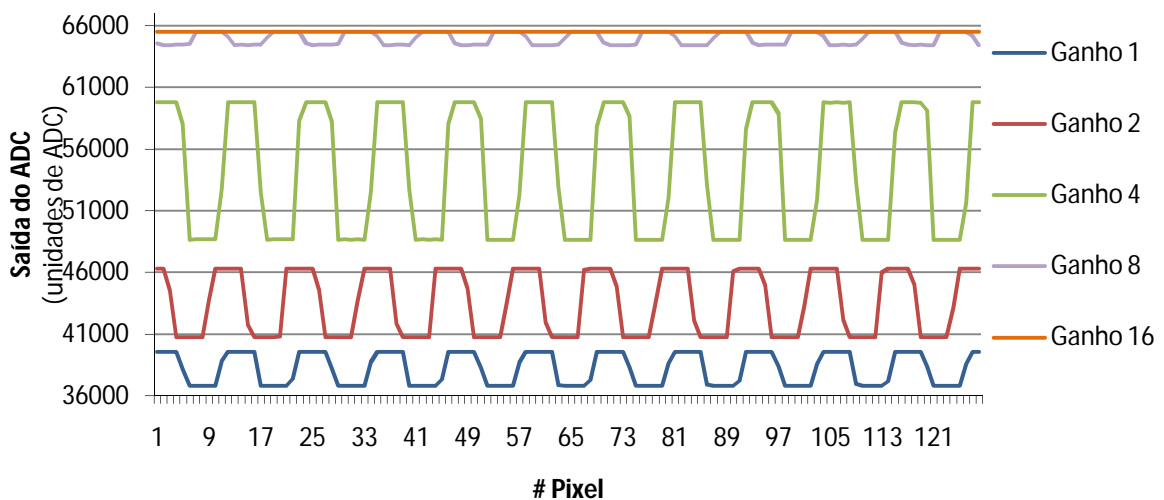


Figura 35: Gráfico representativo da saída do sensor para diversos valores de ganho programável.

As curvas apresentadas na figura 35 resultam de medições únicas para cada um dos respectivos ganhos. A variação do ganho do PGA foi testada quer com a execução do comando DEC quer com a execução do comando INC (ver secções 4.4.1.4. e 4.4.1.5.).

5.2. Resultados obtidos com o sensor de luz da Hamamatsu S3921

Foi programado um conjunto de experiências preliminares utilizando cuvetes de concentrações conhecidas de fluoresceína, e que são descritas nesta secção. Estas experiências foram realizadas com dois sensores de imagem de 128 pixéis cada¹⁷.

A não-linearidade é definida como sendo o desvio máximo entre um valor experimental e a recta de melhor ajuste. A calibração ou função de transferência de um instrumento é fundamental, pois permite converter as unidades de saída do ADC em unidades equivalentes de concentração de fluoresceína (ng/ml). Possibilita também detectar possíveis anomalias do instrumento com o passar do tempo ou das condições da sua utilização. Por estas razões, a calibração deve ser efectuada periodicamente e sempre que algumas das condições se altere, como por exemplo o ganho.

O nível mínimo de detecção pode ser entendido como a sensibilidade do instrumento, isto é, a medida mais pequena de entrada que o sistema é capaz de discriminar. Este parâmetro foi determinado com base nas medidas do escuro. O nível mínimo de detecção pode ser considerado como o valor da grandeza a medir correspondente a duas vezes o desvio padrão das flutuações do fundo com probabilidade de 95% [9]. Neste método, foi seleccionada uma região de pixéis (60 a 80) de cada varrimento e fez-se a sua média. De todos os valores resultantes determinou-se o seu valor médio e o seu desvio padrão.

Nos testes *in vitro* para ambos os sensores foram utilizados os seguintes parâmetros de configuração: 2000 médias/pixel, 650 de largura de pixel, 6 varrimentos (primeiro ignorado) e tempo de exposição de 1,5s. As medições no escuro, também para os dois sensores, tiveram como parâmetros de configuração 2000 médias, 650 de largura de pixel, tempo de exposição de 1,5s e 1000 varrimentos. Os ganhos do circuito são diferentes para os dois sensores (ganho do sensor 2 não optimizado). Estas experiências foram realizadas à temperatura ambiente e com o ângulo da lâmpada de fenda de 45° e uma amplificação óptica de 12X.

¹⁷ Foram também realizadas experiências com sensores de imagem de 256 pixéis.

5.2.1. Sensor 1

A recta de calibração ($S_{ADC_1}(C) = 12,33 \times C + 34646$, onde S_{ADC_1} corresponde ao pico da curva para uma dada concentração e C à concentração de fluoresceína) do sensor 1 está representada na figura 36. Os valores do eixo dos yy's correspondem à saída efectiva do ADC. Para as concentrações de fluoresceína 20, 50 e 100ng/ml o valor do pico resultou da média dos 10 pixéis em torno do valor máximo da curva de cada varrimento. Quanto ao do fundo (0ng/ml), o seu valor corresponde à média dos valores adquiridos em cada varrimento também para a mesma região de pixéis. Verificou-se um erro de linearidade de 1,60%.

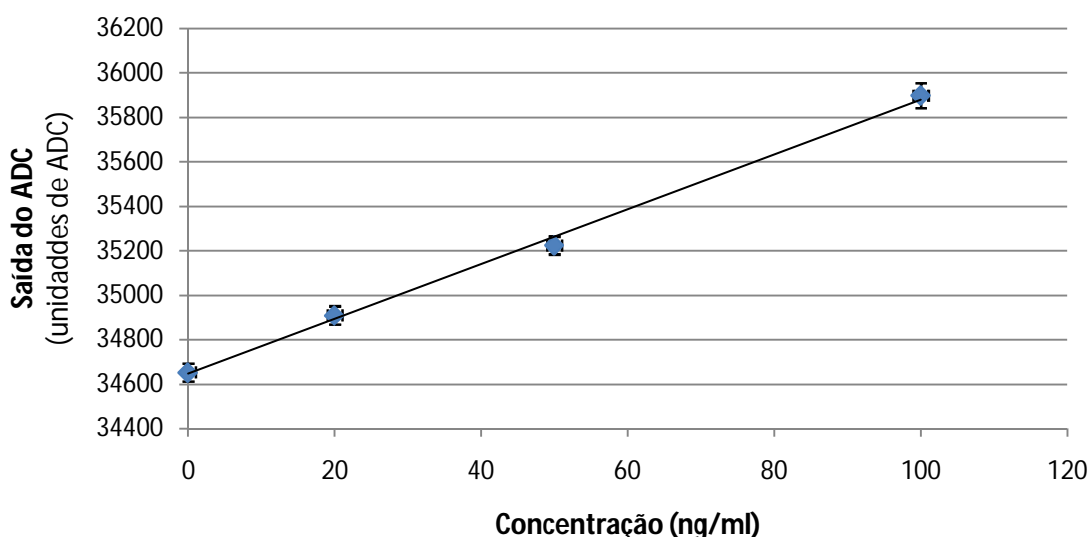


Figura 36: Recta de calibração do sensor 1.

A figura 37 representa a distribuição gráfica das leituras no escuro do sensor 1. Analisando os dados, verifica-se que o fundo no escuro corresponde a $34661,65 \pm 17,34$ unidades de ADC. Recorrendo à recta de calibração, o desvio padrão corresponde a uma variação de 1,40ng/ml. O nível mínimo de detecção é de 2,80 ng/ml.

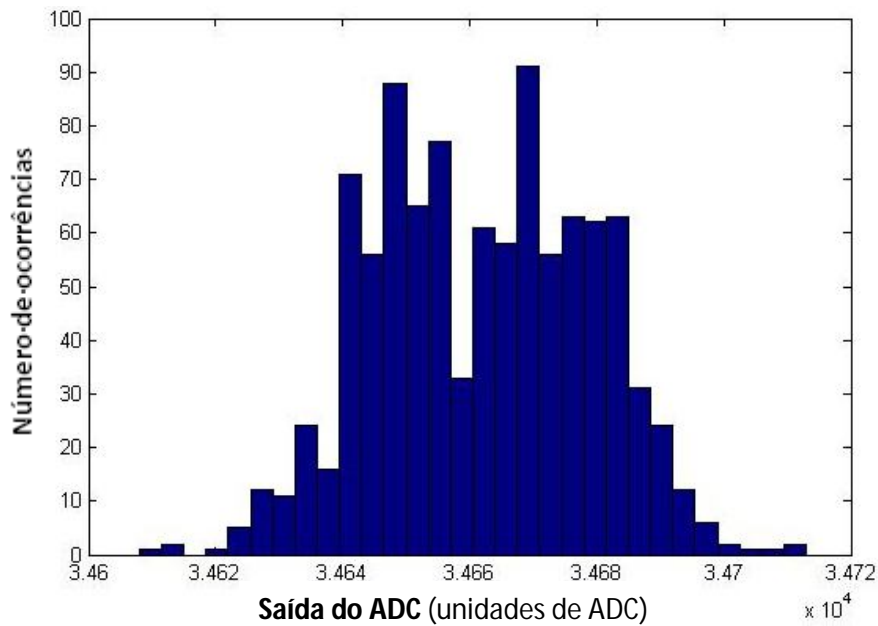


Figura 37: Distribuição das leituras no escuro efectuadas com o sensor 1.

5.2.2. Sensor 2

A figura 38 representa a recta de calibração do sensor 2 ($S_{ADC_2}(C) = 268,3 \times C + 37416$, onde S_{ADC_2} e C correspondem à ao valor médio da saída do sensor para o valor do pico de cada concentração e à concentração de fluoresceína (ng/ml)). O modo de determinação do valor máximo do pico da curva foi o mesmo que para o sensor 1. Da análise dos dados obtidos obteve-se uma não-linearidade de 1,40%. O ganho do circuito eléctrico foi optimizado quando a utilização deste sensor.

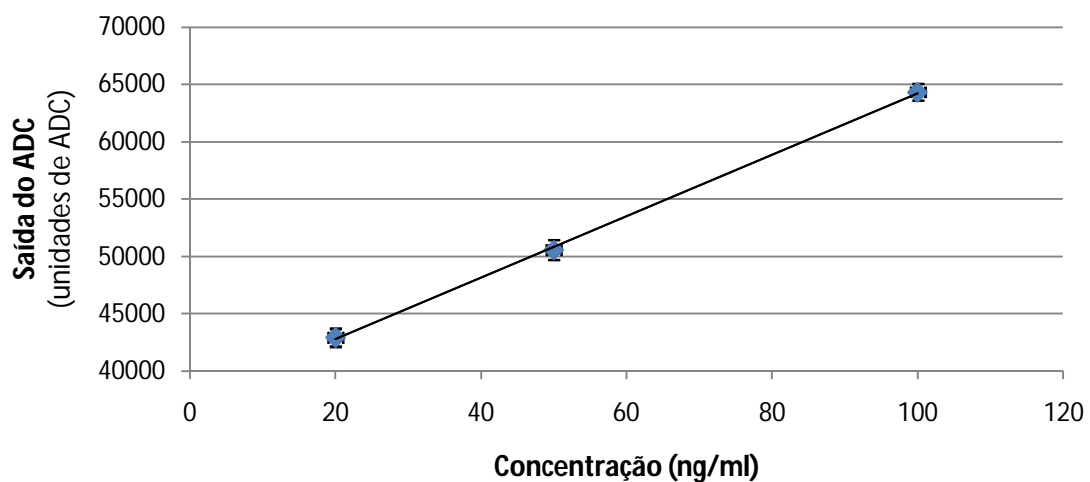


Figura 38: Recta de calibração para o sensor 2.

Foi utilizado o mesmo método que no sensor 1 para a determinação do nível mínimo de detecção. Assim, de acordo com a figura 39, os valores adquiridos apresentam média de 36588,37 unidades de ADC e um desvio-padrão de 586,11 unidades de ADC. Assim, esta incerteza corresponde a um nível mínimo de detecção de 4,36ng/ml.

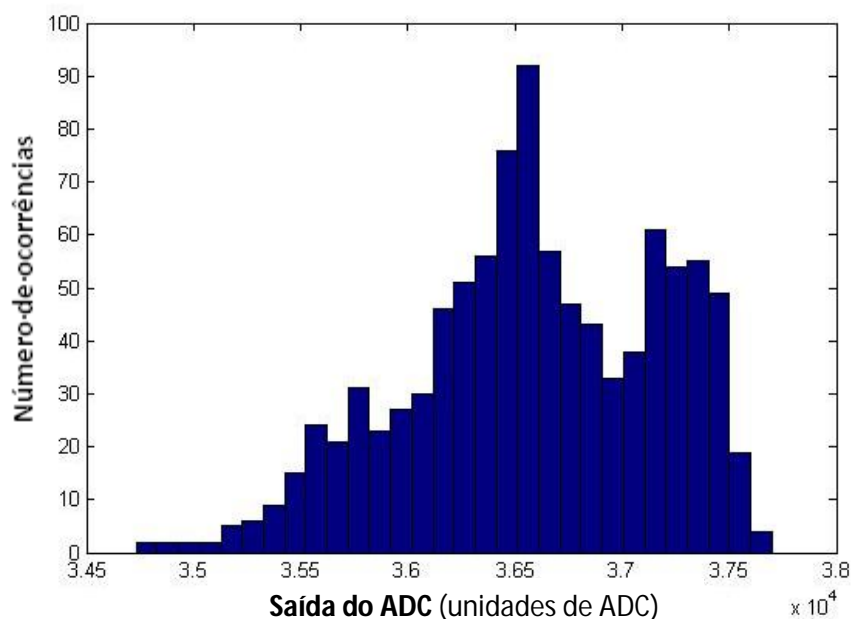


Figura 39: Distribuição gráfica das leituras do fundo no escuro realizadas com o sensor 2.

Da observação da figura 35, verifica-se que o amplificar de ganho programável está a funcionar correctamente, tanto no incremento (comando INC) como na diminuição (comando DEC) do seu ganho.

Nos estudos *in vitro* obteve-se um erro de linearidade de 1,60% para o sensor 1, e 1,40% para o sensor 2. Estes valores obtidos não são muito diferentes dos que foram obtidos com a versão anterior do PAF [8], podendo ainda ser melhorados utilizando por exemplo rectas de calibração diferentes para gamas de concentração de fluoresceína diferentes.

Como dito anteriormente, o nível mínimo de detecção foi determinado com base na leitura do fundo (escuro). Obteve-se um nível mínimo de detecção de 2,80ng/ml para o sensor 1 e de 4,36ng/ml para o sensor 2. Na versão anterior do PAF, o limite mínimo de detecção obtido foi de 1,5ng/ml (valor máximo obtido pelos três métodos), enquanto o do instrumento padrão é de 0,5ng/ml [8]. Contudo ainda é

possível otimizar os resultados obtidos, os quais podem estar a ser afectados quer por erros de operação quer por ruído nos circuitos eléctricos que pode ainda ser minimizado.

6. Conclusões finais

Este capítulo está reservado a uma breve conclusão realçando as dificuldades encontradas durante a execução do trabalho assim como um plano de trabalhos para um futuro próximo.

6.1. Conclusão

Sendo a fluorometria ocular uma área de extrema importância em Oftalmologia, torna-se por isso fundamental o desenvolvimento de métodos e instrumentação de elevada fiabilidade para o seu apoio. Pretende-se assim, desenvolver um instrumento de diagnóstico simples de utilização, para que possa ser um equipamento rotineiro. Seguindo esta linha, estudou-se a nova arquitectura e tentou-se perceber até que ponto o novo sistema poderá funcionar como um fluorómetro ocular. Os resultados preliminares obtidos com o novo SAD são já comparáveis aos anteriormente existentes (PAF e FM). Há no entanto margem para a sua optimização e por isso se elaborou um conjunto de trabalhos para um futuro próximo (secção 6.3.).

O foco principal deste trabalho prendeu-se sobretudo no estudo e teste do novo SAD e compreensão dos seus componentes. Foram surgindo algumas dificuldades as quais estão descritas em 6.2., pois poderão ajudar em desenvolvimentos futuros.

6.2. Dificuldades encontradas ao longo do trabalho

Ao longo do desenvolvimento deste trabalho, foram surgindo algumas dificuldades. A primeira grande dificuldade encontrada surgiu na compreensão de toda a dinâmica do funcionamento do microcontrolador, assim como o entendimento da linguagem C, pois eram matérias desconhecidas para mim, o que logo constituiu um grande desafio.

Uma outra questão cuja resolução consumiu algum tempo foi o excesso tempo de leitura dos dados de saída do SAD. Inicialmente, utilizaram-se as funções *fscanf()* e *fread()* Matlab, porém esse tempo era de aproximadamente 10s, através do interface RS-232, o que era bastante elevado. Experimentou-se também uma *mex-file*, que veio a verificar-se não ser eficaz. Depois de várias tentativas e algumas delas demorosas,

verificou-se que a redução do número de caracteres enviados (/n/r) veio a diminuir bastante o tempo de leitura do SAD.

Para além disto, surgiram vários problemas a nível do *hardware* que se detectaram ao longo do desenvolvimento do trabalho. Entre eles, destaca-se uma ligação errada no primeiro amplificador. Na entrada positiva desse amplificador estava o circuito de ajuste do *offset* do sinal de saída do detector, onde deveria estar a terra. Esta ligação errada causava grandes instabilidades no sinal de saída.

6.3. Trabalho futuro

Para além do estudo do SAD e experiências realizadas ao longo deste ano lectivo, pode-se mencionar um conjunto de possíveis desenvolvimentos para um futuro próximo.

- Continuação dos estudos in vitro, testando a realização de médias após a digitalização do sinal adquirido pelo sensor incluindo média de pixéis vizinhos e varrimentos consecutivos.
- Testes usando outros sensores (256 e 512 pixéis) bem como outras funcionalidades do SAD como a utilização de uma câmara CCD autónoma (ficha D15 incluída).
- Comparação de tempos de processamento utilizando as interfaces RS-232 e USB.
- Estudar métodos de redução de ruído (exemplo: introdução de filtro digitais, controlo de temperatura).
- Continuação do desenvolvimento de interface para utilizador final.

7. Referências

1. Cunha-Vaz, J.G., O equilíbrio ambiental das células visuais. *Colóquio/Ciências*, 1992. **12**: p. 69-82.
2. Bores, L.D. Ocular Anatomy - Anterior Segment Anatomy. 2002 Janeiro de 2008 [citado em 2008 Maio]; Retirado de: http://www.e-sunbear.com/anatomy_03.html.
3. Bores, L.D. Ocular Anatomy - Posterior Segment Anatomy. 2002 Janeiro 2008 [citado em 2008 Maio]; Retirado de: http://www.e-sunbear.com/anatomy_04.html.
4. Scanlon, V.C.S., Sanders, T., Essentials of Anatomy and Physiology. 5ª ed. 2007, Philadelphia: F. A. Davis Company.
5. Morgado, M., Fluorometria ocular não-invasiva : técnicas e instrumentação, in Departamento de Física. 2002, Universidade de Coimbra: Coimbra.
6. Tate, P., Seeley, R.R., Stephens T.D., Anatomia & Fisiologia: Lusodidacta.
7. Francone, C.A., Jacob, S.W., Lossow, W.J., Anatomia e Fisiologia Humana. 1990, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
8. Domingues, J.P.D., Contribuição para o desenvolvimento de nova instrumentação e novos métodos para fluorometria ocular de aplicação clínica - Um Novo Fluorómetro Ocular, Departamento de Física. 1997, Universidade de Coimbra: Coimbra.
9. Lima, M.M.C.L., Palma, J.M.L.M., Medição Simultânea de Velocidade e Concentração em Meios Líquidos. CEC - REC 2003. **16**: p. 83-93.
10. Valeur, B., Molecular Fluorescence: Principles and Applications 2001, Toronto: Wiley-VCH.
11. Vo-Dinh, T., Fluorescence Spectroscopy for Biomedical Diagnostics, in Biomedical Photonics Handbook. 2003, CRC Press: United States of America.
12. Abramowitz, M., et al. Molecular Expressions Microscopy Primer: Light and Color - Fluorescence. 1998 Setembro 2003 [citado em 2008 Maio]; Retirado de: <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/lightandcolor/fluorescencehome.html>.
13. Lakowicz, J.R., Introduction to Fluorescence, in Principles of Fluorescence Spectroscopy, Springer, Editor. 2006, Springer: Singapore. p. 1-24.

14. Abramowitz, M., et al. Molecular Expressions Microscopy Primer: Fluorescence - Jablonski Diagram - Interactive Java Tutorials. 1998 Junho 2006 [citado de 2008 Maio]; Retirado de: <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/jablonski/lightandcolor/>.
15. Herman, B., et al. Molecular Expressions Microscopy Primer: Specialized Microscopy Techniques - Fluorescence - Basics Concepts in Fluorescence 1998 Agosto 2003 [citado de 2008 Maio]; Retirado de: <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/fluorescenceintro.html>.
16. Lakowicz, J.R., Fluorophores, in Principles of Fluorescence Spectroscopy. 2006, Springer: Singapore. p. 63-71.
17. Eutick, M., Sodium Fluorescein - Colourful Past, Bright Future. *The Journal of Ophthalmic Photography*, 2006. **28**(2): p. 66-70.
18. RxList, Inc., Fluorescein 2008 [citado em 2008 Maio]; Retirado de: <http://www.rxlist.com/cgi/generic/fluorescein.htm>.
19. Jacobs, J., Fluorescein Sodium What is it? *Journal of Ophthalmic Photography*, 1992. **14**(2): p. 62.
20. Bennett, T.J. Fundamentals of Fluorescein Angiography Characteristics of Fluorescein [citado em 2008 Abril]; Retirado de: <http://www.opsweb.org/OpPhoto/Angio/FA/FA2.html>.
21. An Introduction to Fluorescence Spectroscopy. 2000 [citado em 2008 Abril]; Retirado de: <http://homepages.wmich.edu/~rsung/files/IntroFluor.pdf>.
22. Bernardes, R.D., Dias, J., Cunha-Vaz, J., Mapping the Human Blood-Retinal Barrier Function. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 2005. **52**(1): p. 106-116.
23. Photonics, H. S3921/S3924 series - NMOS linear image sensor. 2001 [citado em 2007 Outubro]; Retirado de: http://sales.hamamatsu.com/assets/pdf/parts_S/S3921-512q.pdf.
24. Photonics, H. Technical Information SD-26: Characteristics and use of NMOS linear image sensors. 2004 [citado em 2007 Novembro]; Retirado de: http://sales.hamamatsu.com/assets/applications/SSD/nmos_kmpd9001e05.pdf.

25. Fukui, Y. Modulation Transfer Function (MTF). 2003; [citado em 2008 Maio] Retirado de: <http://faculty-web.at.northwestern.edu/med/fukui/ModulationTransferFunction.pdf>.
26. Devices, A. AD526 - Software Programmable Gain Amplifier. 1999; [citado em 2007 Novembro] Retirado de: http://www.datasheetcatalog.org/datasheet/analogdevices/336979966AD526_d.pdf.
27. Instruments, T. ADS1601. 2004; [citado em 2007 Outubro] Retirado de: <http://www.datasheetcatalog.org/datasheet2/5/0who6xwpxs4trhc4l91ooooqucky.pdf>.
28. Iovine, J., PIC Microcontroller Project Book. 1ª ed. 2000, U.S.A.: McGraw-Hill.
29. e., M. CAPÍTULO 2: Microcontrolador PIC16F84 2003 [citado em 2007 Dezembro]; Retirado de : <http://www.mikroe.com/pt/product/books/picbook/capitulo2.htm>.
30. Brasil, d. O dsPIC. [citado em 2008 Maio]; Retirado de: <http://www.dspic.com.br/>.
31. dsPIC30F6011A/6012A/6013A/6014A Data Sheet, M.T. Inc., Editor. 2006.
32. dsPIC30F Family Reference Manual, M.T. Inc., Editor. 2005.
33. Oliveira, A.S. and F.S. Andrade, Sistemas Embarcados - Hardware e Firmware na Prática. 1ª ed. 2006, São Paulo: Editora Érica Ltda.
34. Sanchez, J., Canton, M.P., Mid-Range PIC Architecture, in Microcontroller Programming The Microchip PIC®. 2007, CRC Press: Boca Raton, Florida. p. 141-149.
35. Nawrocki, W. Measurement Systems and Sensors. Artech House.
36. Costa, A.P., Aula 16. 2003 [citado em 2008 Maio] Retirado de: <http://w3.ualg.pt/~apcosta/pin/Teoricas/Teorica16.pdf>.
37. Sanchez, J., Canton, M.P., Communications em Microcontroller Programming The Microchip PIC®. 2007, CRC Press: Boca Raton, Florida. p:339:368.
38. Freitas, K..L.M, Condurú R.T. Controlador de relés utilizando a porta Universal Serial Bus - USB, Centro de Ciências Exactas e Tecnológicas,2006, Universidade da Amazônia, Belém.
39. Rapoport, E., Moraes, I., Bicudo, M., Lemos, P., Universal Serial Bus [citado em 2008 Junho] Retirado de: http://www.gta.ufrj.br/grad/01_1/usb/usb.htm.

40. *Microchip Technology Inc.* dsPIC Digital Signal Controller - Serial Communications using the dsPIC30F SPI™ Module. 2005 [citado em 2008 Maio]; Retirado de: http://techtrain.microchip.com/webseminars/documents/dsPICSPI_033005.pdf.
41. *Vieira, A.* Dimensionamento simplificado de uma linha de distribuição eléctrica em corrente contínua. [citado em 2008 Abril]; Retirado de: http://www.defi.isep.ipp.pt/~asv/isep/informatica/rede_electrica.pdf.
42. *Furlan, R.* Retificadores. [citado em 2008 Abril]; Retirado de: www.lsi.usp.br/~roseli/www/psi2307_2004-Teoria-1-Retif.pdf.
43. *Microchip Technology Inc.* MPLAB ICD 2 2008 [citado de 2008 Junho];Retirado de: http://www.microchip.com/stellent/idcplg?IdcService=SS_GET_PAGE&nodeId=1406&dDocName=en010046.

Apêndices

Nesta secção são apresentados materiais de apoio ao restante trabalho. O apêndice A refere-se à descrição dos parâmetros de configuração da porta série bem como ao detalhe de cada um dos pinos do conector DB-9. No apêndice B é apresentado o esquemático dos modos electrónicos do sistema de aquisição de dados.

Apêndice A: Porta série

A.1. Detalhe dos pinos do conector DB-9.

A tabela 1 mostra o nome e a função do conector DB-9, o utilizado no SAD.

Tabela 1: Detalhe dos pinos do conector DB-9.

Pino	Sinal	Nome	Descrição
1	DCD	<i>Data Carrier Detect</i>	Detecção da portadora
2	RD	<i>Receive Data</i>	Receptor de dados
3	TD	<i>Transmit Data</i>	Transmissor de dados
4	DTR	<i>Data Terminal Ready</i>	Terminal de dados prontos
5	SC	<i>Signal Ground</i>	Terra
6	DSR	<i>Data Set Ready</i>	Dados prontos
7	RTS	<i>Request to Send</i>	Solicitação de envio
8	CTS	<i>Clear to Send</i>	Pronto para envio
9	RING	<i>Ring Indicator</i>	Indicador de chamada

A.2. Descrição dos parâmetros de configuração da porta série

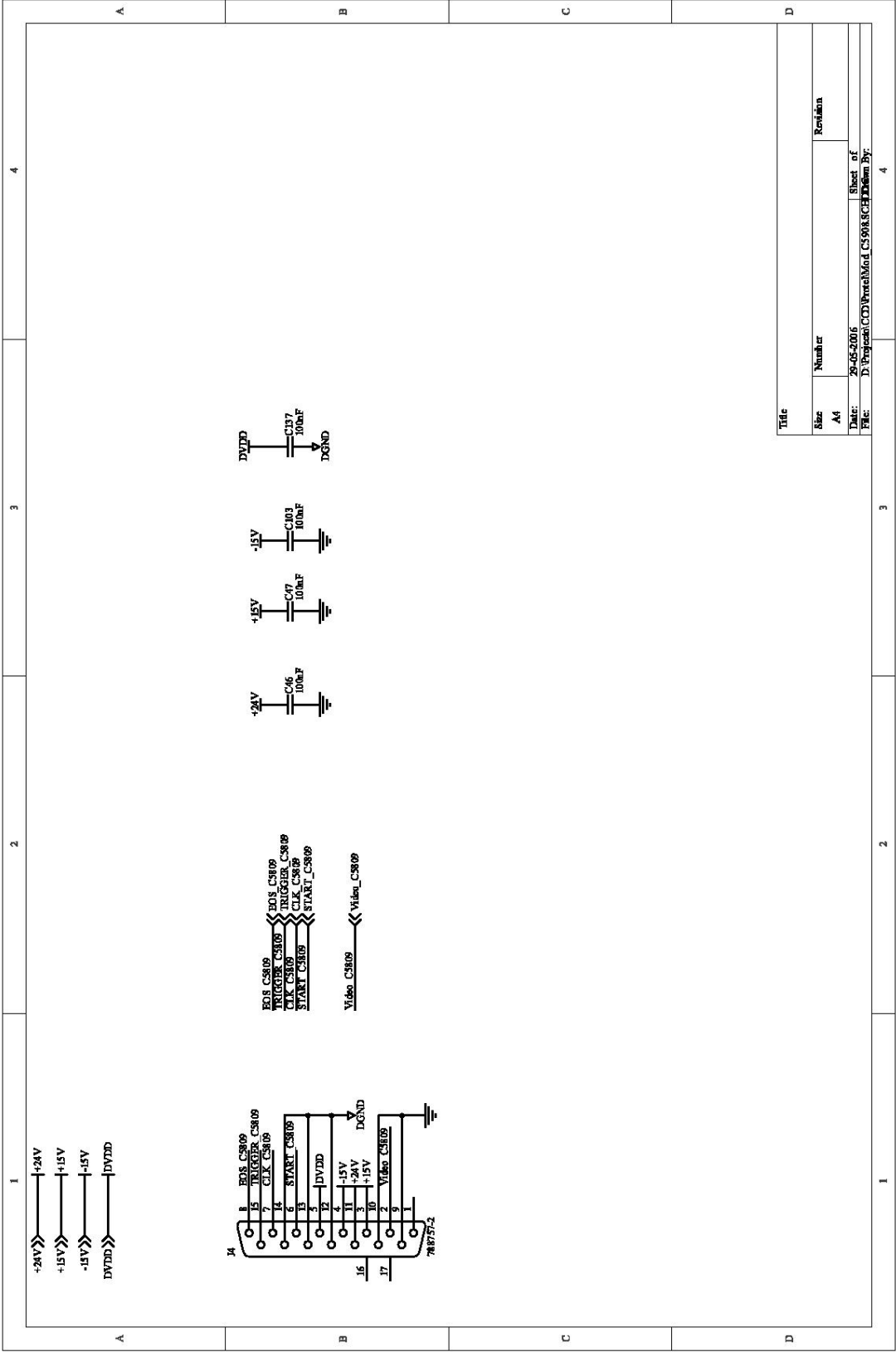
Velocidade de transmissão (Baud Rate): representa o número de bits transmitidos por segundo.

Bits de dados: especifica o número de bits que compõe cada carácter. Pode ser composto por 5, 6, 7 ou 8 *bits*.

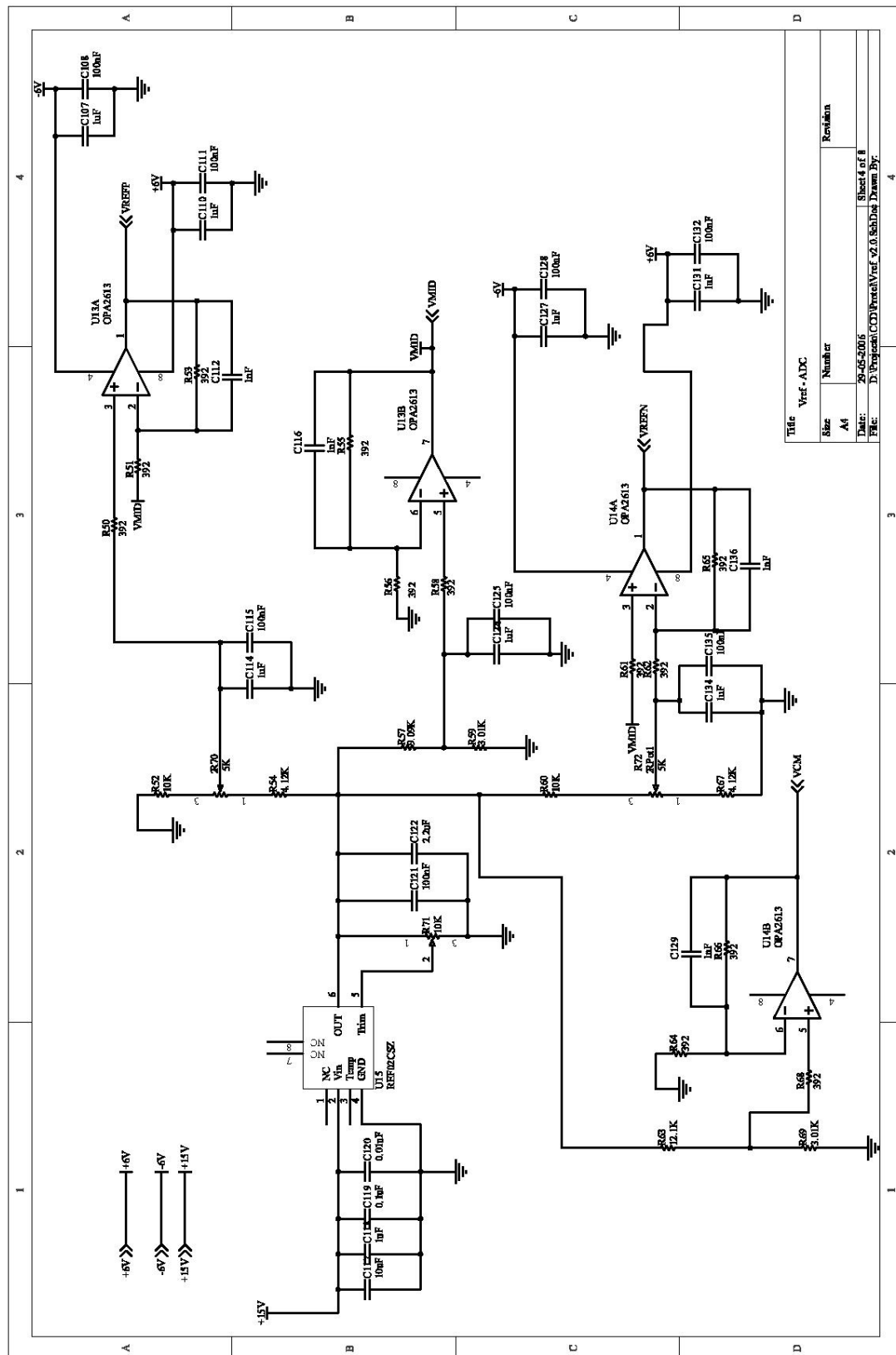
Bit de paridade (*Parity*): este *bit* é opcional. Pode ser definida como paridade par, ímpar ou nenhuma paridade. O bit é transmitido seguindo os *bits* de dados, e tem como principal objectivo se houve erros durante a transmissão de dados.

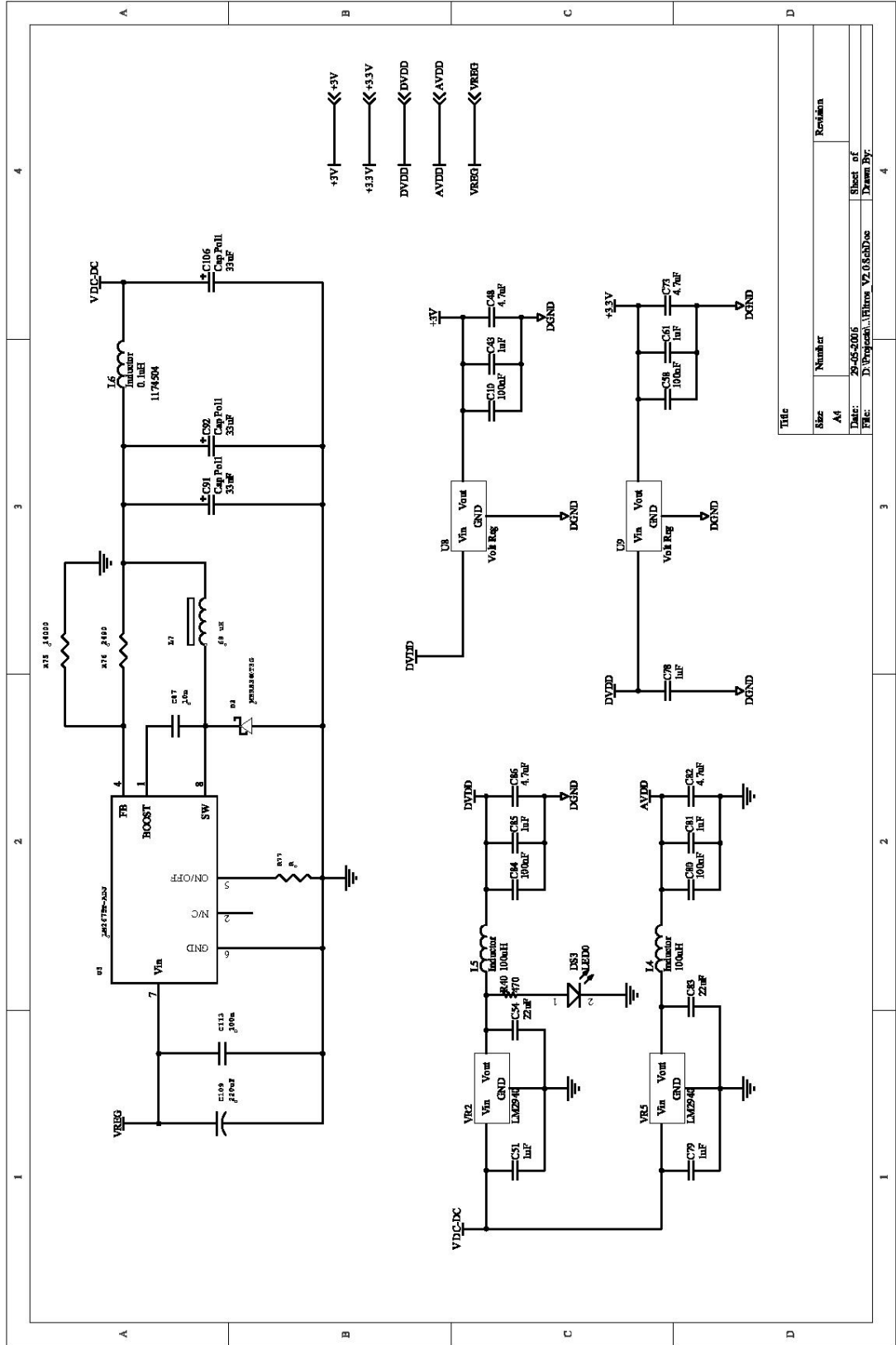
Bits de paragem (*Stop bits*): *bit* que indica o fim de transmissão do carácter. Pode ser definido como 1, 1,5 ou 2 *bits*.

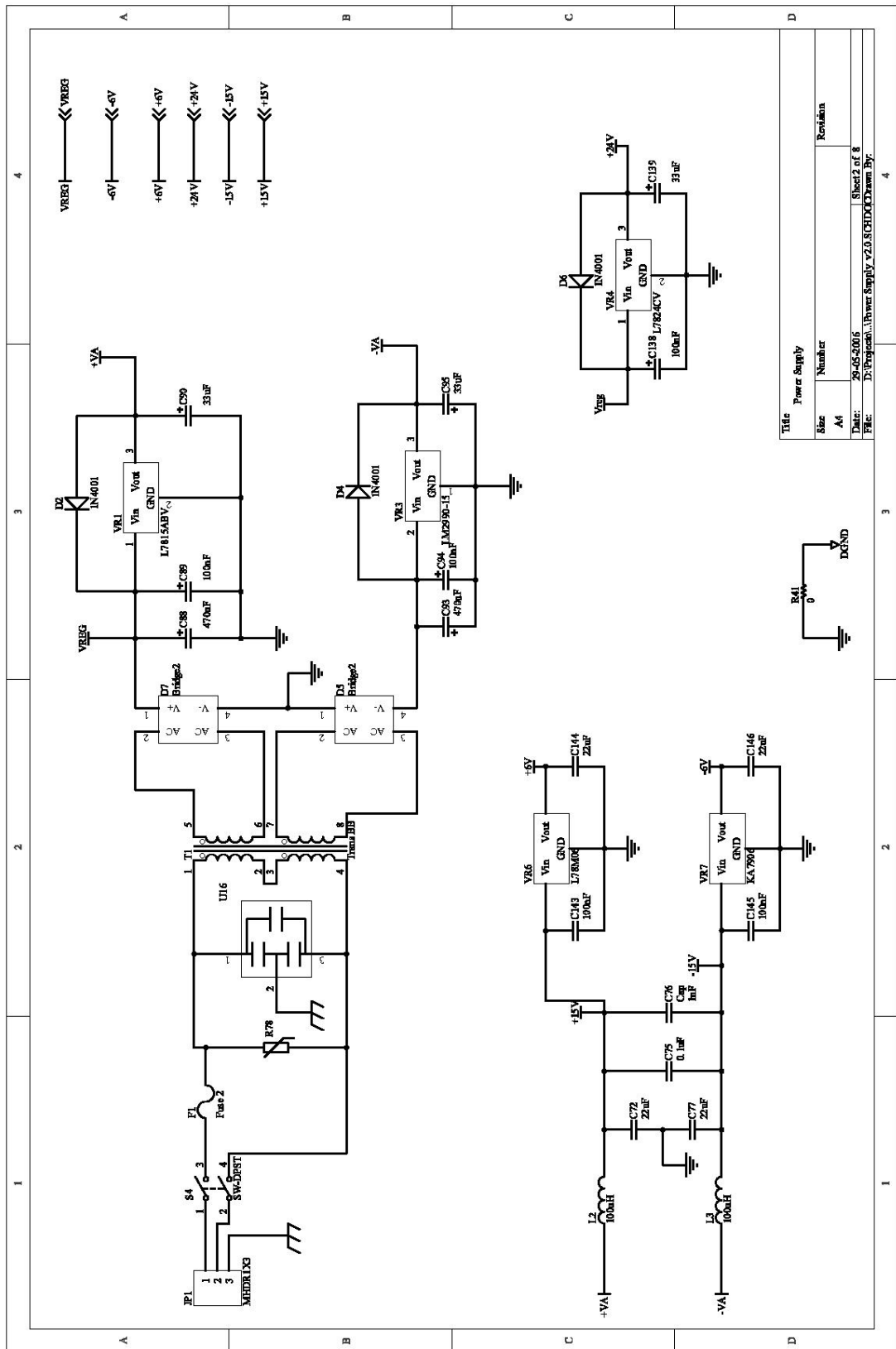
Controlo de fluxo (*Flow Control*): pode ser feito recorrendo a *hardware* ou *software*. Por *hardware*, são usadas as seguintes pinos: RTS (*Request to Send*), CTS (*Clear to Send*), DSR (*Data Set Ready*) e DTR (*Data Terminal Ready*). Por *software*, o controlo do fluxo de sinais é feito XON e XOFF que permite e impede a transmissão de dados.



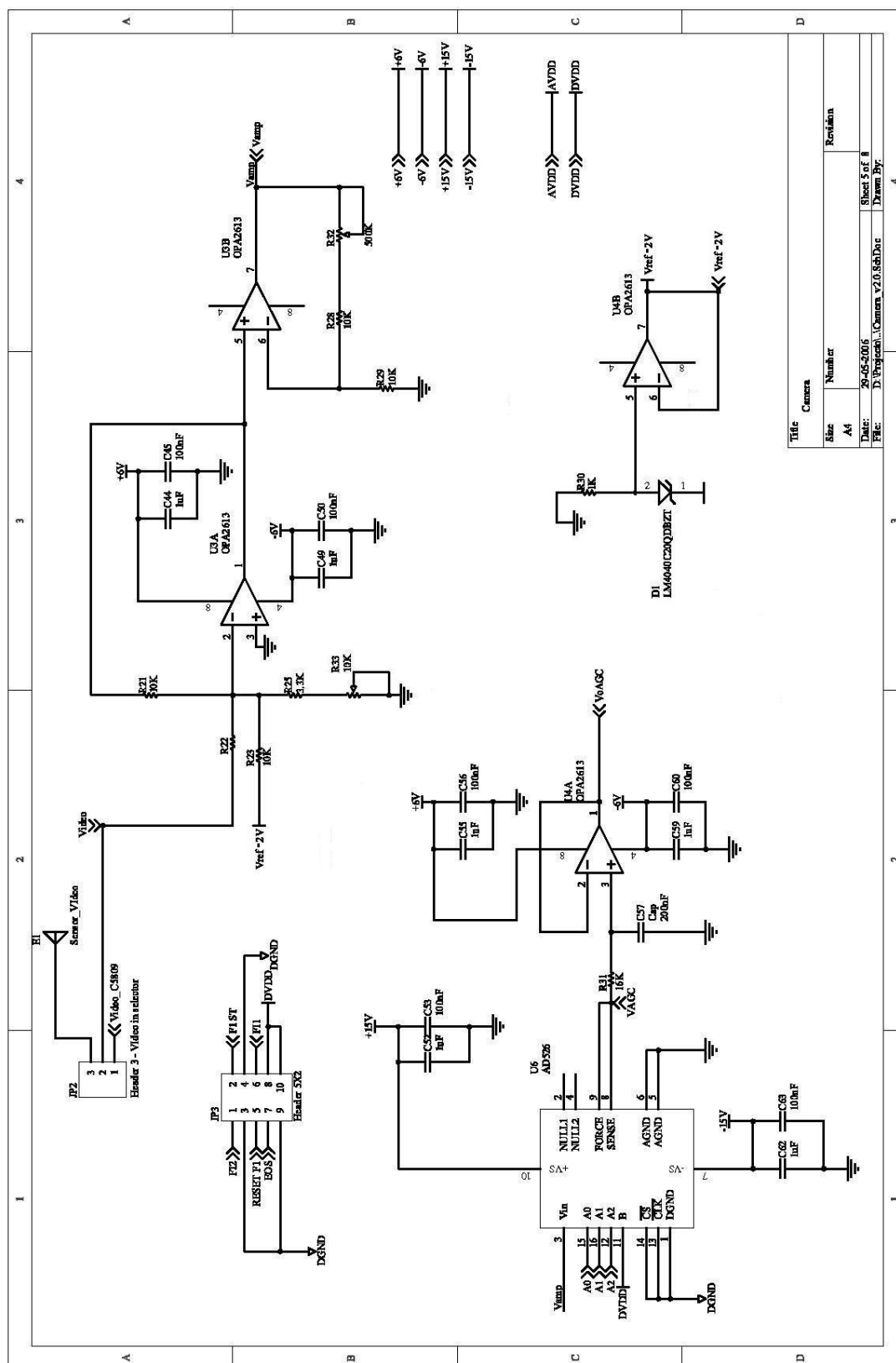
B.2. Módulo da fonte de alimentação

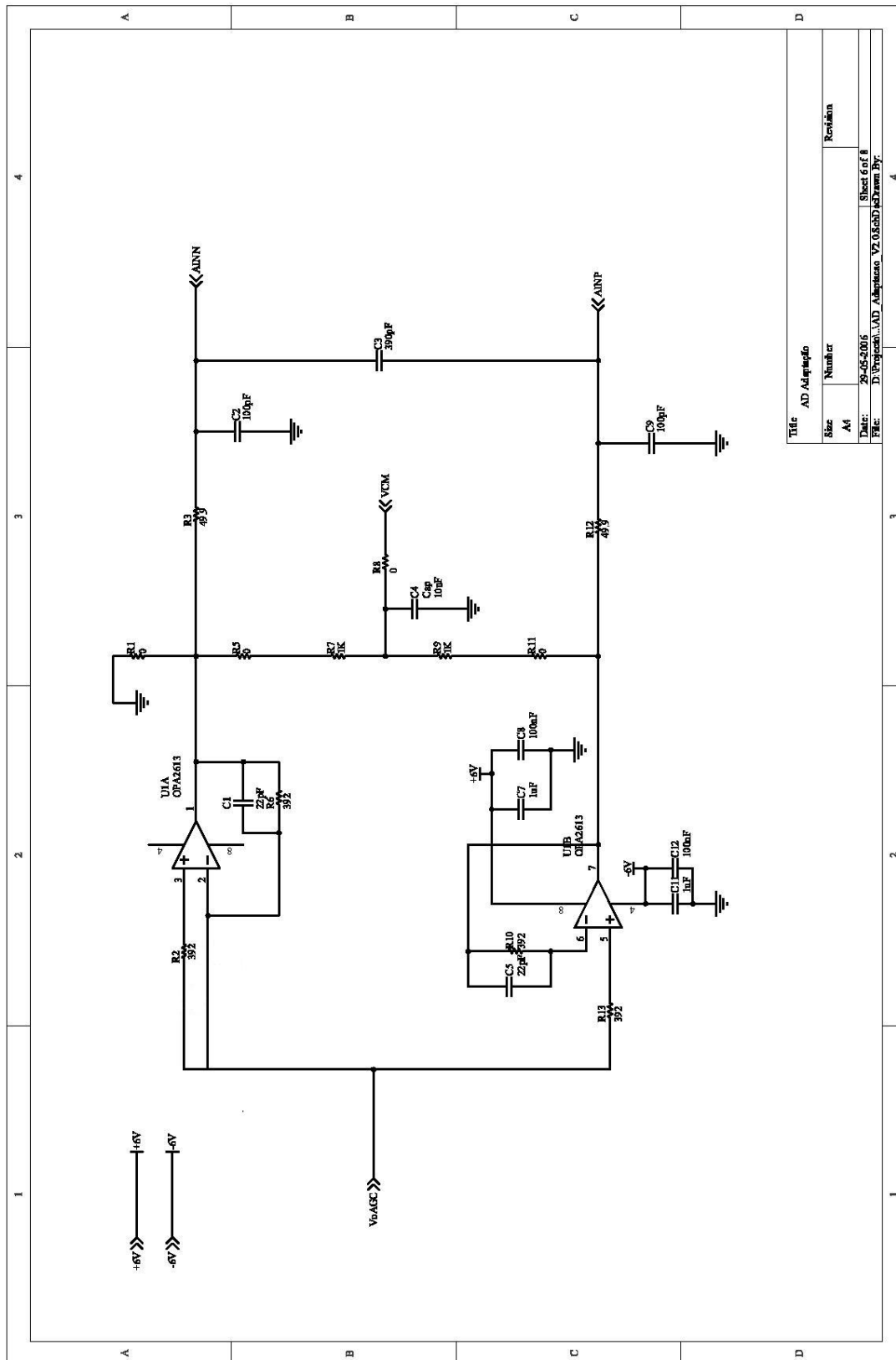






B.3. Módulo do acondicionamento de sinal





Title		AD Adapter
Size	Number	Revision
A4		
Date:	29-05-2006	Sheet 6 of 8
File:	D:\Project\AD Adapter\AD Adapter.dwg	Drawn By:

X



¹ ² ³ ⁴ ⁵ ⁶ ⁷ ⁸ ⁹ ¹⁰ ¹¹ ¹² ¹³ ¹⁴ ¹⁵ ¹⁶ ¹⁷ ¹⁸ ¹⁹ ²⁰ ²¹ ²² ²³ ²⁴ ²⁵ ²⁶ ²⁷ ²⁸ ²⁹ ³⁰ ³¹ ³² ³³ ³⁴ ³⁵ ³⁶ ³⁷ ³⁸ ³⁹ ⁴⁰ ⁴¹ ⁴² ⁴³ ⁴⁴ ⁴⁵ ⁴⁶ ⁴⁷ ⁴⁸ ⁴⁹ ⁵⁰ ⁵¹ ⁵² ⁵³ ⁵⁴ ⁵⁵ ⁵⁶ ⁵⁷ ⁵⁸ ⁵⁹ ⁶⁰ ⁶¹ ⁶² ⁶³ ⁶⁴ ⁶⁵ ⁶⁶ ⁶⁷ ⁶⁸ ⁶⁹ ⁷⁰ ⁷¹ ⁷² ⁷³ ⁷⁴ ⁷⁵ ⁷⁶ ⁷⁷ ⁷⁸ ⁷⁹ ⁸⁰ ⁸¹ ⁸² ⁸³ ⁸⁴ ⁸⁵ ⁸⁶ ⁸⁷ ⁸⁸ ⁸⁹ ⁹⁰ ⁹¹ ⁹² ⁹³ ⁹⁴ ⁹⁵ ⁹⁶ ⁹⁷ ⁹⁸ ⁹⁹ ¹⁰⁰ ¹⁰¹ ¹⁰² ¹⁰³ ¹⁰⁴ ¹⁰⁵ ¹⁰⁶ ¹⁰⁷ ¹⁰⁸ ¹⁰⁹ ¹¹⁰ ¹¹¹ ¹¹² ¹¹³ ¹¹⁴ ¹¹⁵ ¹¹⁶ ¹¹⁷ ¹¹⁸ ¹¹⁹ ¹²⁰ ¹²¹ ¹²² ¹²³ ¹²⁴ ¹²⁵ ¹²⁶ ¹²⁷ ¹²⁸ ¹²⁹ ¹³⁰ ¹³¹ ¹³² ¹³³ ¹³⁴ ¹³⁵ ¹³⁶ ¹³⁷ ¹³⁸ ¹³⁹ ¹⁴⁰ ¹⁴¹ ¹⁴² ¹⁴³ ¹⁴⁴ ¹⁴⁵ ¹⁴⁶ ¹⁴⁷ ¹⁴⁸ ¹⁴⁹ ¹⁵⁰ ¹⁵¹ ¹⁵² ¹⁵³ ¹⁵⁴ ¹⁵⁵ ¹⁵⁶ ¹⁵⁷ ¹⁵⁸ ¹⁵⁹ ¹⁶⁰ ¹⁶¹ ¹⁶² ¹⁶³ ¹⁶⁴ ¹⁶⁵ ¹⁶⁶ ¹⁶⁷ ¹⁶⁸ ¹⁶⁹ ¹⁷⁰ ¹⁷¹ ¹⁷² ¹⁷³ ¹⁷⁴ ¹⁷⁵ ¹⁷⁶ ¹⁷⁷ ¹⁷⁸ ¹⁷⁹ ¹⁸⁰ ¹⁸¹ ¹⁸² ¹⁸³ ¹⁸⁴ ¹⁸⁵ ¹⁸⁶ ¹⁸⁷ ¹⁸⁸ ¹⁸⁹ ¹⁹⁰ ¹⁹¹ ¹⁹² ¹⁹³ ¹⁹⁴ ¹⁹⁵ ¹⁹⁶ ¹⁹⁷ ¹⁹⁸ ¹⁹⁹ ²⁰⁰ ²⁰¹ ²⁰² ²⁰³ ²⁰⁴ ²⁰⁵ ²⁰⁶ ²⁰⁷ ²⁰⁸ ²⁰⁹ ²¹⁰ ²¹¹ ²¹² ²¹³ ²¹⁴ ²¹⁵ ²¹⁶ ²¹⁷ ²¹⁸ ²¹⁹ ²²⁰ ²²¹ ²²² ²²³ ²²⁴ ²²⁵ ²²⁶ ²²⁷ ²²⁸ ²²⁹ ²³⁰ ²³¹ ²³² ²³³ ²³⁴ ²³⁵ ²³⁶ ²³⁷ ²³⁸ ²³⁹ ²⁴⁰ ²⁴¹ ²⁴² ²⁴³ ²⁴⁴ ²⁴⁵ ²⁴⁶ ²⁴⁷ ²⁴⁸ ²⁴⁹ ²⁵⁰ ²⁵¹ ²⁵² ²⁵³ ²⁵⁴ ²⁵⁵ ²⁵⁶ ²⁵⁷ ²⁵⁸ ²⁵⁹ ²⁶⁰ ²⁶¹ ²⁶² ²⁶³ ²⁶⁴ ²⁶⁵ ²⁶⁶ ²⁶⁷ ²⁶⁸ ²⁶⁹ ²⁷⁰ ²⁷¹ ²⁷² ²⁷³ ²⁷⁴ ²⁷⁵ ²⁷⁶ ²⁷⁷ ²⁷⁸ ²⁷⁹ ²⁸⁰ ²⁸¹ ²⁸² ²⁸³ ²⁸⁴ ²⁸⁵ ²⁸⁶ ²⁸⁷ ²⁸⁸ ²⁸⁹ ²⁹⁰ ²⁹¹ ²⁹² ²⁹³ ²⁹⁴ ²⁹⁵ ²⁹⁶ ²⁹⁷ ²⁹⁸ ²⁹⁹ ³⁰⁰ ³⁰¹ ³⁰² ³⁰³ ³⁰⁴ ³⁰⁵ ³⁰⁶ ³⁰⁷ ³⁰⁸ ³⁰⁹ ³¹⁰ ³¹¹ ³¹² ³¹³ ³¹⁴ ³¹⁵ ³¹⁶ ³¹⁷ ³¹⁸ ³¹⁹ ³²⁰ ³²¹ ³²² ³²³ ³²⁴ ³²⁵ ³²⁶ ³²⁷ ³²⁸ ³²⁹ ³³⁰ ³³¹ ³³² ³³³ ³³⁴ ³³⁵ ³³⁶ ³³⁷ ³³⁸ ³³⁹ ³⁴⁰ ³⁴¹ ³⁴² ³⁴³ ³⁴⁴ ³⁴⁵ ³⁴⁶ ³⁴⁷ ³⁴⁸ ³⁴⁹ ³⁵⁰ ³⁵¹ ³⁵² ³⁵³ ³⁵⁴ ³⁵⁵ ³⁵⁶ ³⁵⁷ ³⁵⁸ ³⁵⁹ ³⁶⁰ ³⁶¹ ³⁶² ³⁶³ ³⁶⁴ ³⁶⁵ ³⁶⁶ ³⁶⁷ ³⁶⁸ ³⁶⁹ ³⁷⁰ ³⁷¹ ³⁷² ³⁷³ ³⁷⁴ ³⁷⁵ ³⁷⁶ ³⁷⁷ ³⁷⁸ ³⁷⁹ ³⁸⁰ ³⁸¹ ³⁸² ³⁸³ ³⁸⁴ ³⁸⁵ ³⁸⁶ ³⁸⁷ ³⁸⁸ ³⁸⁹ ³⁹⁰ ³⁹¹ ³⁹² ³⁹³ ³⁹⁴ ³⁹⁵ ³⁹⁶ ³⁹⁷ ³⁹⁸ ³⁹⁹ ⁴⁰⁰ ⁴⁰¹ ⁴⁰² ⁴⁰³ ⁴⁰⁴ ⁴⁰⁵ ⁴⁰⁶ ⁴⁰⁷ ⁴⁰⁸ ⁴⁰⁹ ⁴¹⁰ ⁴¹¹ ⁴¹² ⁴¹³ ⁴¹⁴ ⁴¹⁵ ⁴¹⁶ ⁴¹⁷ ⁴¹⁸ ⁴¹⁹ ⁴²⁰ ⁴²¹ ⁴²² ⁴²³ ⁴²⁴ ⁴²⁵ ⁴²⁶ ⁴²⁷ ⁴²⁸ ⁴²⁹ ⁴³⁰ ⁴³¹ ⁴³² ⁴³³ ⁴³⁴ ⁴³⁵ ⁴³⁶ ⁴³⁷ ⁴³⁸ ⁴³⁹ ⁴⁴⁰ ⁴⁴¹ ⁴⁴² ⁴⁴³ ⁴⁴⁴ ⁴⁴⁵ ⁴⁴⁶ ⁴⁴⁷ ⁴⁴⁸ ⁴⁴⁹ ⁴⁵⁰ ⁴⁵¹ ⁴⁵² ⁴⁵³ ⁴⁵⁴ ⁴⁵⁵ ⁴⁵⁶ ⁴⁵⁷ ⁴⁵⁸ ⁴⁵⁹ ⁴⁶⁰ ⁴⁶¹ ⁴⁶² ⁴⁶³ ⁴⁶⁴ ⁴⁶⁵ ⁴⁶⁶ ⁴⁶⁷ <